

Hyperforin-Biosynthese –
Molekulare Analyse von Polyketid-Synthasen aus
Hypericum perforatum* und *Hypericum calycinum

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Petra Klingauf
geb. Zapletalová
aus Bruntál

1. Referent: Prof. Dr. Ludger Beerhues
2. Referent: Prof. Dr. Thomas Hartmann

eingereicht am: 12. 7. 2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 25. 8. 2004

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Klingauf, P., El-Moghazy, S. A. M., Mellenthin, A., Beerhues L.
Hyperforins in *Hypericum calycinum* cell cultures. Eingereicht.

Klingauf, P., Beuerle, T., Beerhues, L.
Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. Eingereicht.

Tagungsbeiträge in Form von Posterpräsentationen

Zapletalová, P., El-Moghazy, S. A. M., Beerhues, L. (2000)
Adhyperforin in cell cultures of *Hypericum calycinum*. 48th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA) and International Congress “Natural Products Research in the New Millenium” (Zürich, Switzerland, 3.-7. September 2000).

Zapletalová, P., El-Moghazy, S. A. M., Eberhardt, A., Beerhues, L. (2000)
Adhyperforin in cell cultures of *Hypericum calycinum*. Tagung “Biosynthesis and Accumulation of Secondary Products” (Halle, 24.-27. September 2000).

Zapletalová, P., Beerhues, L. (2001)
Adhyperforin in cell cultures of *Hypericum calycinum*. Tagung “Plant Molecular Biology for the New Millenium” (Třeboň, Czech Republic, 17.-21. September 2001).

Tagungsbeitrag in Form eines Kurzvortrags

Zapletalová, P., Beerhues, L. (2003)
Hyperforin-Biosynthese – Molekulare Analyse von Polyketid-Synthasen aus *Hypericum perforatum* und *Hypericum calycinum*. Doktorandentagung der DPhG (Düsseldorf, 7.-9. März 2003).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Depression	1
1.1.1 Johanniskrautextrakte	1
1.2 Johanniskraut - Geschichte und Botanik	2
1.2.1 Inhaltsstoffe	3
1.3 Hyperforin	4
1.3.1 Pharmakologie	4
1.3.2 Vorkommen	5
1.4 Polyketid-Synthasen	5
1.5 <i>Hypericum calycinum</i>	6
1.6 Zielsetzung	7
2. Material	8
2.1 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer	8
2.1.1 Chemikalien	8
2.1.2 Nährmedien für Pflanzengewebekulturen	9
2.1.3 Lösungen für biochemische Untersuchungen	10
2.1.4 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie	12
2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide	14
2.1.6 Nukleotide	15
2.2 Pflanzenmaterial	17
2.2.1 Pflanzengewebekulturen	17
2.2.1.1 Anlegen einer Zellsuspensionskultur	17
2.2.1.2 Kultivierung von Kallus- und Zellsuspensionskulturen	17
2.2.2 Intakte Pflanzen	18
2.3 Geräte	18
3. Methoden	19
3.1 Analytische und biochemische Arbeiten	19
3.1.1 Charakterisierung von pflanzlichen Zellkulturen	19
3.1.1.1 Frisch und Trockengewicht	19
3.1.1.2 Gehalt an Hyperforinen	19

3.1.1.3	Fütterung von Hyperforin-Vorstufen	20
3.1.2	Synthese der Referenzsubstanz Phorisobutyrophenon	20
3.1.2.1	Aufreinigung des Syntheseprodukts	20
3.1.3	Dünnschichtchromatographie (DC)	21
3.1.4	UV-Spektroskopie	22
3.1.5	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	23
3.1.5.1	Instrumentierung	23
3.1.5.2	Fließmittel (Mobile Phase)	23
3.1.6	GC-MS – Analytik	24
3.1.6.1	Instrumentierung	24
3.1.6.2	Probenbereitung	24
3.1.7	HPLC-MS	25
3.1.7.1	Instrumentierung	25
3.1.7.2	Probenbereitung	25
3.1.8	Fast protein liquid chromatography (FPLC)	25
3.1.8.1	Anionenaustauschchromatographie	25
3.1.8.2	Affinitätschromatographie	26
3.1.9	Radioscann-Analyse	27
3.1.10	Enzymologische Untersuchungen	28
3.1.10.1	Gewinnung von Rohextrakt	28
3.1.10.2	Entfernung von niedermolekularen Verbindungen	28
3.1.10.3	Bestimmung von Proteingehalten	28
3.1.10.4	Ammoniumsulfatfällung	29
3.1.10.5	Polyketid-Synthase-Ansätze	29
3.1.10.6	Bestimmung von pH- und Temperatur-Optima	30
3.1.10.7	DTT Optimum	30
3.1.11	Charakterisierung der überexprimierten Proteine	31
3.1.11.1	Untersuchung der Substratspezifität	31
3.1.11.2	Bestimmung von kinetischen Daten	31
3.1.12	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
3.1.12.1	Herstellung des Gels und Probenvorbereitung	32
3.1.12.2	Elektrophorese und Detektion der Proteinbanden	32
3.1.12.3	Bestimmung des Molekulargewichts	32

3.2	Molekularbiologische Methoden	33
3.2.1	Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i>	33
3.2.2	Lagerung von Bakterienkulturen	33
3.2.3	Messung der optischen Dichte (OD)	33
3.2.4	Oligonukleotide	33
3.2.4.1	Einbau von Restriktionsschnittstellen in Primer	34
3.2.5	Isolierung von poly(A ⁺)-RNA	34
3.2.6	Quantifizierung von Nukleinsäuren	34
3.2.7	Fällung von DNA	35
3.2.8	cDNA Synthese	35
3.2.8.1	5'- und 3'-RACE mittels SMART-Verfahren	35
3.2.8.2	Synthese von 5'-cDNA mittels Terminaler Transferase	36
3.2.9	Polymerasekettenreaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction; PCR)	36
3.2.9.1	Touch-down PCR	38
3.2.9.2	Nested PCR	38
3.2.10	Agarose-Gelelektrophorese	38
3.2.10.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
3.2.11	Herstellung eines T-Überhangvektors	39
3.2.12	Restriktion mittels Typ-II-Endonukleasen	39
3.2.13	Ligation mit der T4-DNA-Ligase	40
3.2.14	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	40
3.2.14.1	Herstellung kompetenter Zellen	40
3.2.14.2	Transformation von <i>E. coli</i>	41
3.2.14.3	Insertionskontrolle	41
3.2.15	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	41
3.2.15.1	Plasmid-Minipräparation	42
3.2.15.2	Plasmid-Minipräparation mit einem Kit	42
3.2.16	DNA-Sequenzierung	42
3.2.16.1	Probenaufbereitung	42
3.2.16.2	Sequenziergel	43
3.2.16.3	Auswertung der Sequenzierdaten	43
3.2.17	Expression von GST-Fusionsproteinen	43
3.2.17.1	Expression	44
3.2.17.2	Zellaufschluss	44

3.2.17.3 Spaltung des GST-Fusionsproteins	44
4. Ergebnisse	45
4.1 Pflanzenmaterial	45
4.1.1 Zellkulturen von <i>Hypericum calycinum</i>	45
4.1.2 Intakte Pflanzen	46
4.2 Nachweis von Hyperforinen in <i>H. calycinum</i> -Zellkulturen	46
4.3 Stabilität der Hyperforine	48
4.4 Versuche zur Optimierung der Nährmedien	49
4.5 Charakterisierung der <i>H. calycinum</i> -Zellkulturen in BDS-Medium	49
4.5.1 Adhyperforingehalt	50
4.5.2 Fütterungsexperimente	50
4.5.3 Elicitierung	51
4.6 Detektion von Enzymaktivitäten	51
4.6.1 Analyse des enzymatisch gebildeten Phlorisobutyrophenons	53
4.6.2 Synthese der Referenzsubstanz Phlorisobutyrophenon	54
4.6.3 Veränderung der spezifischen Enzymaktivitäten während des Zellkulturwachstums	55
4.6.4 Anionenaustauschchromatographie der Polyketid-Synthasen	56
4.6.5 Stabilität von Enzymextrakten und Produkten	57
4.7 Klonierung von PKS aus <i>H. calycinum</i> -Zellkulturen und <i>H. perforatum</i> -Pflanzen	58
4.7.1 Isolierung von poly(A ⁺)-RNA	58
4.7.2 Synthese von degenerierten Oligonukleotiden	59
4.7.3 Amplifikation von PKS-Fragmenten mit degenerierten Primern	60
4.7.4 Amplifikation von CHS-Fragmenten	62
4.7.5 Amplifikation von BUS-Fragmenten mit degenerierten Primern	63
4.7.6 Amplifikation von BUS-Fragmenten mit genspezifischen Primern	64
4.7.7 Amplifikation von BPS-cDNAs	65
4.7.8 Gewinnung der vollständigen PKS-cDNAs	66
4.7.9 Klonierung, Selektion und Sequenzierung	68
4.7.10 Amplifikation von ORFs für die heterologe Expression	69
4.8 Heterologe Expression der klonierten PKS	72
4.8.1 Affinitätschromatographie der rekombinanten PKS	72
4.8.2 Kontrolle der heterologen Expression	73

4.9	Überprüfung der Aktivität der rekombinanten PKS	75
4.10	Charakterisierung der rekombinanten Enzyme	76
4.10.1	Temperatur-, pH- und DTT-Abhängigkeit sowie Substratspezifität	77
4.10.2	Enzymkinetik	77
4.11	Charakterisierung der rekombinanten Chalkon-Synthase aus <i>Hypericum perforatum</i> (H.p.CHS)	78
4.11.1	Temperatur-, pH- und DTT-Abhängigkeit sowie Substratspezifität	78
4.11.2	Enzymkinetik	80
4.12	Charakterisierung der rekombinanten Chalkon-Synthase aus <i>Hypericum calycinum</i> (H.c.CHS)	81
4.12.1	Temperatur-, pH- und DTT-Abhängigkeit sowie Substratspezifität	81
4.12.2	Enzymkinetik	83
4.13	Charakterisierung der rekombinanten Benzophenon-Synthase aus <i>Hypericum calycinum</i> (H.c.BPS)	84
4.13.1	Temperatur-, pH- und DTT-Abhängigkeit sowie Substratspezifität	84
4.13.2	Enzymkinetik	86
4.14	Zusammenfassung der kinetischen Daten	87
5.	Diskussion	88
6.	Zusammenfassung	100
7.	Literaturverzeichnis	102
	Anhang	I

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BDS	modifiziertes B5-Medium, nach Dunstan und Short (1977)
BPS	Benzophenon-Synthase
BSA	Rinderserumalbumin
BUS	Isobutyrophenon-Synthase
cDNA	copy-DNA
CHS	Chalkon-Synthase
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	1,4-Dithiothreitol
FG	Frischgewicht
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
H.c.	<i>Hypericum calycinum</i>
H.p.	<i>Hypericum perforatum</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
LB	Luria-Bertani
LS	Linsmeier und Skoog
MAO	Monoamin-Oxidase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zur Ladung
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanz)
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TdT	Terminale Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
UV	Ultraviolett
VPS	Isovalerophenon-Synthase
w/v	Massenprozent
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -galactopyranosid

Aminosäuren

A = Ala	Alanin
C = Cys	Cystein
D = Asp	Asparaginsäure
E = Glu	Glutaminsäure
F = Phe	Phenylalanin
G = Gly	Glycin
H = His	Histidin
I = Ile	Isoleucin
K = Lys	Lysin
L = Leu	Leucin
M = Met	Methionin
N = Asn	Asparagin
P = Pro	Prolin
Q = Gln	Glutamin
R = Arg	Arginin
S = Ser	Serin
T = Thr	Threonin
V = Val	Valin
W = Trp	Tryptophan
Y = Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

1.1 Depression

Psychische Störungen sind häufig, wobei in den meisten Fällen Depressionen unterschiedlichen Schweregrades diagnostiziert werden (Bauer und Gastpar, 1998). In den Industrieländern ist die Depression Volkskrankheit Nr. 1 mit schwerer Beeinträchtigung der Betroffenen. Schätzungen gehen davon aus, dass mehr als zwei Drittel der ca. 12 000 jährlichen Suizide in Deutschland auf diese Erkrankung zurückgehen. Depression wird definiert als wochenlanger Rückzug, bei dem „die Traurigkeit ihren Sinn verliert, Anstoß zur Neuorientierung zu geben“ (Gastpar, 1998). Übliche Stimmungstiefs gehen vorüber, während eine Depression über Wochen, Monate, manchmal sogar Jahre anhält. Frauen erkranken doppelt so häufig wie Männer und die Krankheit manifestiert sich in ihrem Leben später (Gastpar, 1998). Depressionen sind multifaktorielle Erkrankungen, die häufig im Zusammenhang mit anderen psychischen und internistischen Leiden auftreten. Leider werden sie oft nicht erkannt und/oder nicht adäquat behandelt.

Die Erforschung der Ursachen beruht auf epidemiologischen Befunden sowie der Untersuchung der Wirkmechanismen von Antidepressiva. Eine Beeinträchtigung der synaptischen Kommunikation von Neurotransmittern im zentralen Nervensystem spielt eine wichtige Rolle (Gastpar, 1998).

1.1.1 Johanniskrautextrakte

Die antidepressiv wirksamen Substanzklassen unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur und ihrem biochemischen Wirkmechanismus. Die meisten Antidepressiva führen zu einer vermehrten Bereitstellung von Neurotransmittern wie Noradrenalin und Serotonin an den Synapsen und verursachen eine Stimmungsaufhellung. Neben den synthetischen Antidepressiva (z.B. Trizyklika, selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer = SSRI) werden Zubereitungen aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen eingesetzt. Sie haben sich in den letzten Jahren in der Therapie depressiver Verstimmungen einen festen Platz erobert. Zudem wurden sie auch in die initialen Behandlungsempfehlungen aufgenommen.

Johanniskraut-Präparate zählen zu den am besten geprüften Phytopharmaka. Bis Herbst 2002 wurden 36 kontrollierte Doppelblind-Studien an Patienten mit leichten bis mittelschweren

Depressionen publiziert (Schulz, 2003). Sie haben die Wirksamkeit gezeigt, sowie die gute Verträglichkeit und geringe Quote an unerwünschten Wirkungen belegt. Allerdings müssen einige relevante Arzneimittelinteraktionen, z.B. mit Cyclosporin und Protease-Hemmer berücksichtigt werden.

Ähnlich wie bei synthetischen Antidepressiva sind die Therapieergebnisse dosis- und behandlungszeitabhängig. In den meisten klinischen Studien wurde eine Dosierung von dreimal täglich 300 mg *Hypericum*-Extrakt vorgenommen (Müller et al, 1999). Die Latenzzeit beträgt 2-3 Wochen, was auf eine Veränderung der Rezeptordichte der Neurotransmitter-Rezeptoren zurückgeführt wird.

Da synthetische Antidepressiva deutlich teurer und reicher an Nebenwirkungen sind, zählen Johanniskrautextrakte unter wirtschaftlichen wie auch ethischen Gesichtspunkten bei der Behandlung leichter und mittelschwerer Depressionen zu den besten zur Zeit verfügbaren Antidepressiva (Schulz, 2003).

1.2 Johanniskraut - Geschichte und Botanik

Die wegen ihrer medizinischen Wirkungen interessante Art wurde von Carl von Linné 1753 in seinem Werk "Species plantarum" als *Hypericum perforatum*, als "durchlöchertes" oder "perforiertes" Johanniskraut bezeichnet (Abb. 1-1). Der Gattungsname *Hypericum* leitet sich ab von "hyper" = auf, über und "ereikon" = Heide und bedeutet "auf der Heide wachsendes Kraut" bzw. "größer als Heidekraut" (Hölzl et al., 1994). Der Artname bezieht sich auf die Blätter, die wie durchstochen aussehen. Dies geht auf große mit ätherischem Öl gefüllte Sekretbehälter zurück. Beim Zerreiben der Blüten und Knospen tritt ein roter Saft aus, weshalb die Pflanze auch als Blutkraut, Hexenkraut, Mannskraut, Herrgottsblut oder Johannisblut bezeichnet wurde. Schon seit langer Zeit werden Arten der Gattung *Hypericum* als Arzneimittel für somatische und psychische Leiden genutzt.



Abb. 1-1: *Hypericum perforatum* L.

1.2.1 Inhaltsstoffe

H. perforatum enthält mehrere Gruppen pharmakologisch interessanter Sekundärstoffe (Tab. 1-1).

Tab. 1-1: Johanniskraut - Inhaltsstoffe

Inhaltsstoffgruppe	Beispiele	Wirkungen
Flavonoide	Quercetin, Rutin, Quercetinglykoside: Hyperosid, Quercetrin	antidepressiv
Biflavonoide	Amentoflavon	sedativ
Acylphloroglucine	Hyperforin, Adhyperforin	antidepressiv, antibakteriell
Naphthodianthrone	Hypericin, Pseudohypericin	antidepressiv, antiviral, photosensibilisierend
Xanthone	1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon, Kielcorin	antidepressiv
Ätherisches Öl	2-Methyl-3-buten-2-ol	sedativ (s.o.)

Die Therapieerfolge mit dem Phytopsychofarmakon haben auch die Suche nach den wirksamkeitsrelevanten Inhaltsstoffen vorangetrieben. Lange Zeit galten die Hypericine (Abb.1-2) als die Hauptwirksubstanzen von Johanniskraut-Zubereitungen. Diese Befunde

bestätigten sich aber nicht (Müller, 1998). Die biochemischen und tierexperimentellen Untersuchungen belegen, dass die antidepressive Wirksamkeit von Johanniskraut auf dem Zusammenspiel mehrerer Wirkstoffklassen beruht. In letzter Zeit deuten viele Untersuchungen darauf hin, dass ein Phloroglucin-Derivat, das Hyperforin (Abb. 1-3), ein wesentlicher pharmakologischer Bestandteil ist (Chatterjee et al., 1998).

Phloroglucin-Derivate kommen im Pflanzenreich verbreitet als Sekundärstoffe vor. Sie sind von den Dryopteridaceae (*Dryopteris filix-mas*) bis zu den Cannabaceae (Humulone, Lupulone in *Humulus lupulus*) zu finden (Butterweck und Nahrstedt, 2003). In *Hypericum*-Arten liegen die Phloroglucin-Derivate ähnlich wie im Hopfen prenyliert vor.

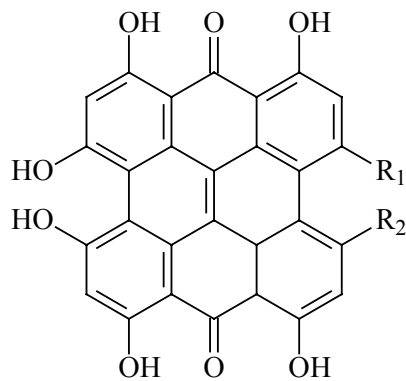


Abb. 1-2: R₁ = R₂ = CH₃ Hypericin
R₁ = CH₃; R₂ = CH₂OH Pseudohypericin

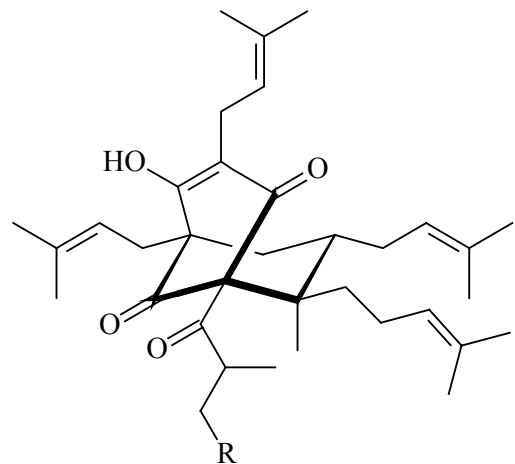


Abb. 1-3: R = H Hyperforin
R = CH₃ Adhyperforin

1.3 Hyperforin

1.3.1 Pharmakologie

In biochemischen *in vitro*-Testsystemen und im Tiermodell wurde für Hyperforin eine Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme nachgewiesen. Hyperforin hemmt mit ähnlicher Effizienz den *reuptake* von Serotonin, Noradrenalin, Dopamin, γ -Aminobuttersäure (GABA), L-Glutamat und Aspartat (Chatterjee et al., 2001). Dieses breite Spektrum der Wiederaufnahmehemmung ist bis heute für kein anderes Antidepressivum bekannt (Müller, 1998). *In vitro* wurde der Mechanismus der Hyperforinwirkung aufgeklärt. Hyperforin inhibiert die Serotonin-Wiederaufnahme durch Erhöhung der intrazellulären Na⁺-Konzentration. Die extrazelluläre Konzentration wird jedoch nicht erreicht, was Hyperforin

von einem Natrium-Ionophor wie Monensin unterscheidet. Wahrscheinlich greift Hyperforin an einem Natrium-Protonen-Tauscher an. Dieser Mechanismus würde die Nicht-Selektivität der Wirkung erklären, da der Transport der Neurotransmitter über Natriumgradient-getriebene Symporter erfolgt. Die Hemmung ist nicht-kompetitiv, wohingegen das synthetische Antidepressivum Citalopram, ein SSRI, die Wiederaufnahme kompetitiv hemmt (Müller et al., 1999).

An Maus, Ratte und Mensch wurde die Pharmakokinetik nach oraler Gabe untersucht. Hyperforin ist trotz seiner Instabilität gut bioverfügbar (Biber et al., 1998). Die Halbwertszeit beim Menschen liegt bei 9 Stunden, der maximale Plasmaspiegel wird bereits nach 4 Stunden erreicht und die Blut-Hirn-Schranke wird überwunden.

1.3.2 Vorkommen

Hyperforin ist sowohl in frischem als auch getrocknetem Johanniskraut in hohen Konzentrationen enthalten. Es wurden 2-4 % Hyperforin im Kraut und bis 8 % in Früchten gefunden (Erdelmeier, 1998). Neben Hyperforin wurde in Blüten und Früchten ein zweites Acylphloroglucin, das Adhyperforin, detektiert (Abb. 1-3; Maisenbacher und Kovar, 1992). Blüten enthalten durchschnittlich 0,2 % und Früchte bis zu 2 % Adhyperforin.

1.4 Polyketid-Synthasen

An der Bildung der Hyperforine ist eine Polyketid-Synthase beteiligt (Zapletalová, 1999). Polyketid-Synthasen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen katalysieren die Biosynthese einer ganzen Reihe von pharmakologisch interessanten Naturprodukten. Polyketide werden z.B. als Antibiotika, Immunsuppressiva, Antineoplastika oder Antimykotika eingesetzt. Obwohl sie strukturell komplex und divers sind, ist der Mechanismus ihrer Biosynthese ähnlich, nämlich eine Verknüpfung von Acetyl-Einheiten zu Poly- β -keto-Verbindungen.

Die Enzyme werden in drei große Gruppen aufgeteilt: PKS I, PKS II und PKS III. Alle drei Typen leiten sich wahrscheinlich evolutiv von den Enzymen der Fettsäure-Biosynthese ab. Substrate und Intermediate sind mit *carrier*-Molekülen verestert: entweder mit einem kleinen Molekül, dem Coenzym A, oder dem etwa 9 kDa großen Acylcarrierprotein (ACP). Der bekannteste Vertreter der PKS I-Gruppe ist die Erythromycin-Synthase, die aus drei gigantischen multifunktionalen Polypeptiden (jeweils etwa 350 kDa) besteht. Diese bilden

Module mit mehreren Domänen. In PKS II sind die Enzymaktivitäten mit distinkten Proteinen assoziiert. Charakteristische Produkte sind phenolische Verbindungen.

PKS III sind kleinere Enzyme (Homodimere, ca. 84 kDa), die an einem einzigen aktiven Zentrum pro Untereinheit alle Schritte der Biosynthese katalysieren: Decarboxylierung, Kondensation, Zyklisierung und Aromatisierung. Sie unterscheiden sich in der Präferenz für das Startermolekül, der Zahl der Additionen von C₂-Einheiten und dem Mechanismus der Zyklisierung. Evolutiv leiten sie sich von der β -Ketoacyl-Synthase der Fettsäure-Biosynthese ab. Der bekannteste Vertreter ist die Chalkon-Synthase (CHS), weshalb Typ III PKS auch als CHS-verwandte Enzyme bezeichnet werden.

Die hier untersuchten PKS des Typs III katalysieren die sequentielle Kondensation von einem Starter-CoA-Ester mit drei Molekülen Malonyl-CoA (Abb. 1-4). Es folgt die intramolekulare Zyklisierung des Intermediats zu einem neuen aromatischen Ring. Aus der kürzlich aufgeklärten Kristallstruktur einer CHS weiß man, dass drei Aminosäuren (Cys 164, His 303 und Asn 336) im katalytischen Zentrum essenziell sind und auch in anderen CHS-verwandten Enzymen hoch konserviert vorliegen (Ferrer et al., 1999).

Diese funktionell verschiedenen pflanzlichen PKS III weisen auf der Aminosäuresequenz-Ebene 40-80 % Homologie zu den CHS auf. Die CHS kommt in höheren Pflanzen ubiquitär vor und CHS-verwandte Enzyme haben sich wahrscheinlich aus ihr im Laufe der Evolution abgeleitet.

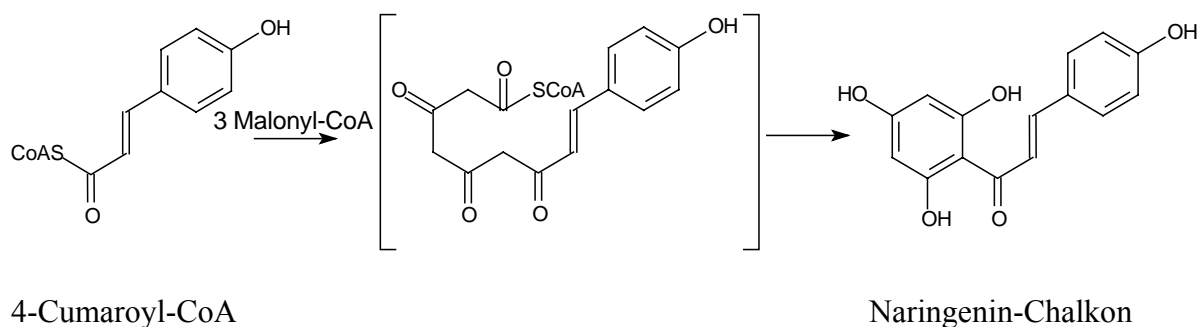


Abb. 1-4: Reaktion der Chalkon-Synthase

1.5 *Hypericum calycinum*

Zellkulturen von verschiedenen *Hypericum*-Arten (*H. calycinum*, *H. perforatum*, *H. androsaemum* und *H. gnidioides*) wurden auf Hyperforin-Bildung untersucht (Zapletalová, 1999). Dabei zeigte sich, dass nur Kulturen von *H. calycinum* Hyperforine, vor allem das

Adhyperforin, enthalten. Sie stellen daher ein gutes *in vitro*-System für die Untersuchung der Biosynthese von Hyperforinen dar. Zudem gab es erste biochemische Hinweise, dass das Grundgerüst der Hyperforine von einer Typ III-PKS gebildet wird.

Interessanterweise zeigten alkoholische Extrakte aus intakten Pflanzen von *H. calycinum* im Test mit Mäusen eine ähnliche Wirkung auf das zentrale Nervensystem wie die aus *H. perforatum* gewonnenen Extrakte (Öztürk, 1997). Es wurden auch Auszüge aus anderen *Hypericum*-Spezies untersucht (z.B. *H. hyssopifolium* ssp. *elongatum* var. *elongatum*), die allerdings keine antidepressive Aktivität besaßen. Außerdem wurden Phloroglucin-Derivate aus *H. calycinum* isoliert, die in *in vitro*-Tests antimykotische, antiplasmodiale und zytotoxische Aktivität zeigten (Decosterd et al., 1989; Decosterd et al., 1991).



Abb. 1-6: *Hypericum calycinum*

1.6 Zielsetzung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese der Hyperforine. Die Untersuchungen wurden an den Adhyperforin-produzierenden Zellkulturen von *H. calycinum* sowie intakten Pflanzen von *H. perforatum* durchgeführt. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf den Polyketid-Synthasen, die kloniert, heterolog exprimiert und vergleichend charakterisiert werden sollten.

2. Material

2.1 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer

2.1.1 Chemikalien

Biochemische und molekularbiologische Reagenzien

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
DMSO	Fluka
Agar-Agar	Roth
D-Glukose	Fluka
Methyljasmonat (Jasmonsäuremethylester)	Serva
Isobutyryl-CoA Lithiumsalz 90-95 %	Sigma Aldrich
Malonyl-CoA Lithiumsalz	Sigma Aldrich
Benzoyl-CoA	Sigma Aldrich
[2- ¹⁴ C] Malonyl-CoA	Amersham Biosciences
Phlorbenzophenon	ICN
Naringenin	Sigma
Select Yeast Extract	Life Technologies
Select Peptone	Life Technologies
IPTG	Sigma Aldrich
X-Gal	Sigma Aldrich
Agarose NEEO Ultra	Roth
Formamid	Sigma Aldrich
Acrylamid	Gibco-BRL
Bis-Acrylamid	Gibco-BRL
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
TEMED	Bio-Rad
SDS	Roth

Alle anderen Chemikalien: p.A. oder HPLC Qualität

2.1.2 Nährmedien für Pflanzengewebekulturen

Alle Medienbestandteile wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reinstwasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. Mit Alufolie verschlossene Kolben mit 50 ml Medium wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

<i>Medium</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Herstellung des Mediums und Verwendung</i>
BDS-Flüssigmedium (modifiziertes B5 Medium; Gamborg et al, 1968; Dunstan und Short, 1977)	I CaCl ₂ ·2H ₂ O 150 mg/l KNO ₃ 2530 mg/l NH ₄ NO ₃ 320 mg/l NH ₄ H ₂ PO ₄ 230 mg/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 134 mg/l MgSO ₄ ·7H ₂ O 247 mg/l MnSO ₄ ·4H ₂ O 13,2 mg/l ZnSO ₄ ·7H ₂ O 2,0 mg/l	Stammlösungen mit 800 ml Wasser vereinigen. Saccharose darin lösen und pH auf 5,5 einstellen. Mit Wasser auf einen Liter auffüllen. Autoklavieren. Nährmedium für Zellsuspensionskulturen
	II CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,039 mg/l KI 0,75 mg/l CoCl ₂ ·6H ₂ O 0,025 mg/l Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0,25 mg/l H ₃ BO ₃ 3,0 mg/l NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 172 mg/l	
	III FeSO ₄ 27,85 mg/l TitriplexIII (Na ₂ EDTA·2H ₂ O) 37,25 mg/l	
	IV Nicotinsäure 1,0 mg/l Thiaminiumdichlorid 10,0 mg/l Pyridoxolhydrochlorid 1,0 mg/l myo-Inosit 100,0 mg/l	
	V Kinetin (6-Furfurylaminopurin) 100 mg/l Dicamba 7,5 mg/l (3,6-Dichloro-2-methoxybezoessäure)	
	VI Saccharose 30 g/l	

LS-Flüssigmedium (Linsmeier und Skoog, 1965)	I KNO ₃ 1900 mg/l NH ₄ NO ₃ 1650 mg/l CaCl ₂ ·2H ₂ O 40 mg/l MgSO ₄ ·7H ₂ O 70 mg/l KH ₂ PO ₄ 170 mg/l II MnSO ₄ ·H ₂ O 16,90 mg/l ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0,60 mg/l KI 0,83 mg/l H ₃ BO ₃ 6,20 mg/l Na ₂ MoO ₄ 0,25 mg/l FeSO ₄ ·7H ₂ O 27,80 mg/l CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,025 mg/l CoCl ₂ ·6H ₂ O 0,025 mg/l III Titriplex III (Na ₂ EDTA·2H ₂ O) 41,30 mg/l IV myo – Inosit 100,0 mg/l Thiaminiumchlorid 0,4 mg/l V 2,4-Dichlorphenoxy- Essigsäure 0,90 µM 1-Naphtylessigsäure 1,04 µM VI Saccharose 30,0 g/l	Stammlösungen mit 800 ml Wasser vereinigen. Saccharose darin lösen und mit Wasser auf einen Liter auffüllen. pH von 6,0 bis 6,3 mit konzentrierter NaOH einstellen. Autoklavieren. Nährmedium für Zellsuspensionskulturen.
LS-Festmedium	siehe LS-Medium, aber mit Zusatz von 8,0 g/l SELECT Agar unter Erwärmung des Mediums auf ca. 80 °C	Kulturmedium für Pflanzenkalli.

2.1.3 Lösungen für biochemische Untersuchungen

Puffer zur Extraktion und Enzyminkubation

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Herstellung und Lagerung</i>
Extraktionspuffer 0,1 M Kaliumphosphat- Puffer pH 7 oder 7,5 + 0,1 mM DTT	Kaliumdihydrogenphosphat 1,36 g DTT 15,4 mg Reinstwasser ad 100 ml	pH mit KOH einstellen, bei 4 °C lagern, DTT immer frisch zugeben

Inkubationspuffer 0,1 M Kaliumphosphat- Puffer pH 7 oder 7,5	Kaliumdihydrogenphosphat 1,36 g Reinstwasser ad 100 ml	pH mit KOH einstellen, bei 4 °C lagern
--	---	--

Lösung zur Regeneration der PD₁₀- Säulen (Amersham Biosciences)

NaOH Stammlösung	NaOH 1 M	die Lösung vor Gebrauch 8:50 mit bidest. Wasser verdünnen.
------------------	----------	---

Puffer zur Enzymreinigung

Q-Puffer A pH 7,5	20 mM Tris 0,242 g 1 mM DTT 150 µg Reinstwasser ad 100 ml	pH auf 7,5 einstellen
Q-Puffer B pH 7,5	20 mM Tris 0,242 g 0,5 M KCl 3,72 g 1 mM KCl 150 µg Reinstwasser ad 100 ml	pH auf 7,5 einstellen
Elutionspuffer (Puffer B)	50 mM Tris HCl 10 mM Glutathion (red.)	pH auf 8,0 einstellen, bei 4 °C lagern
PBS Puffer (Puffer 4)	NaCl 4,09 g KCl 0,1 g Na ₂ HPO ₄ 0,89 g KH ₂ PO ₄ 0,12 g Reinstwasser ad 500 ml	kühl lagern
Waschpuffer (Puffer 2) 0,1 M Kaliumphosphat- Puffer pH 7 oder 7,5	Kaliumdihydrogenphosphat 1,36 g Reinstwasser ad 100 ml	pH mit KOH einstellen, bei 4 °C lagern

Bestimmung des Proteingehaltes

Bradford Lösung	Coomassie®-Brilliant blue G-250 100 ml Ethanol 96 % 50 ml Orthophosphorsäure 100 ml Reinstwasser ad 1000 ml	Coomassie in Ethanol lösen, Phosphorsäure zugeben und mit Wasser auf 1 l auffüllen. Bei 4 °C lagern.
-----------------	--	--

Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese (PAGE)

Sammelgel	Bidest. Wasser 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) Acrylamid/Bis 30 % 10 % (w/v) SDS 10 % (w/v) APS TEMED	3,0 ml 1,3 ml 0,65 ml 0,05 ml 0,1 ml 5 µl	
Trenngel (12 %)	Bidest. Wasser 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) Acrylamid/Bis 30 % 10 % (w/v) SDS 10 % (w/v) APS TEMED	3,3 ml 2,5 ml 4,0 ml 0,05 ml 0,1 ml 5 µl	
Probenpuffer	Bidest. Wasser 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) Glycerin 10 % (w/v) SDS β-Mercaptoethanol 0,5 % (w/v) Bromphenolblau	2,7 ml 1,0 ml 2,0 ml 3,3 ml 0,5 ml 0,5 ml	bei 4 °C lagern
10x Laufpuffer	Tris Glycin Na-SDS Bidest. Wasser	15 g 72 g 5 g ad 500 ml	bei 4 °C lagern, vor Gebrauch 1:10 verdünnen
Färbelösung	Coomassie-blau R 250 Stammlsg. Methanol Essigsäure Bidest. Wasser	25 ml 100 ml 20 ml ad 200 ml	
Coomassie-blau Stammlsg.	Coomassie-blau R 250 Bidest. Wasser	0,5 g 50 ml	Farbstoff in Wasser lösen, filtrieren
Entfärber	Methanol Essigsäure Bidest. Wasser	30 ml 20 ml ad 200 ml	

2.1.4 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie**Medien zur Kultivierung von *E.coli***

LB Medium	Bacto-pepton Hefeextrakt NaCl Bidest. Wasser	10 g 5 g 10 g ad 1000 ml	pH auf 7 einstellen, autoklavieren
SOC Medium	Bacto-pepton Hefeextrakt 1 M NaCl 1 M KCl in 97 ml bidest. Wasser lösen, autoklavieren und abkühlen lassen; dann zugeben:	2 g 0,5 g 1 ml 0,25 ml	

	2 M Mg ⁺ Stammlsg.	1 ml	
	2 M Glukose	1 ml	
	Bidest. Wasser	ad 100 ml	
	Bei -20 °C lagern		
2 M Mg ⁺ Stammlsg.	MgCl ₂ ·6H ₂ O	20,33 g	sterilfiltrieren
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,65 g	
	Bidest. Wasser	ad 100 ml	

Lösungen für die Transformation und Selektion von E. coli

0,5 M IPTG Lösung	IPTG	6 g	sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern
	Bidest. Wasser	ad 500 ml	
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid	100 mg	in Aluminiumfolie einpacken und bei -20 °C lagern
	N,N'-Dimethylformamid	2 ml	

Antibiotika

Ampicillin	Ampicillin	100 mg	sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern
	Bidest. Wasser	ad 1 ml	
Chloramphenicol	Chloramphenicol	30 mg	bei -20 °C lagern
	Ethanol 100 %	ad 1 ml	

Puffer für den Zellaufschluss mit Lysozym

Aufschlusspuffer	Tris-HCl	20 mM	pH auf 7,8 einstellen
------------------	----------	-------	-----------------------

Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

50x TAE	Tris	2 M	mit Eisessig auf pH 8 einstellen
	EDTA	0,05 M	
TBE-Puffer (für Sequenziergele)	Tris	90 mM	
	Borsäure	90 mM	
	EDTA	2 mM	
Ladepuffer (zum Sequenzieren)	25 mM EDTA	1 ml	Formamid mit Harz trocknen
	Formamid	5 ml	
	Dextranblau	0,1 mg	
Sequenziergel	Harnstoff	9 g	
	10x TBE Puffer	3,0 ml	
	Bidest. Wasser	11,5 ml	
	30 % Acrylamid	3,75 ml	
	TEMED	0,01 ml	
	10 % (w/v) APS	230 µl	

Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Puffer P1	Tris-HCl EDTA RNase A	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl und EDTA Lösungen sterilfiltrieren, mischen, pH auf 8,0 einstellen, RNase A vor Gebrauch frisch zugeben
Puffer P2	NaOH SDS	0,2 M 1 % (w/v)	autoklavieren
Puffer P3	Kaliumacetat	2,55 M	pH auf 4,8 einstellen, autoklavieren
Natriumacetat Lösung (pH 5)	Natriumacetat	3 M	pH auf 4 einstellen
TE-Puffer	Tris-HCl EDTA	10 mM 1 mM	für genomische DNA auf pH 8,0 einstellen; für Plasmide auf pH 7,6

Enzyme

DNA-Synthese	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase Superskript II Thermoscript MMLV-Reverse Transkriptase	Fa. Life Technologies, MBI-Biotech, Peqlab Fa. Peqlab Fa. Stratagene Fa. Life Technologies Fa. Life Technologies Fa. Life Technologies Fa. Sigma, MBI-Biotech
Restriktion	<i>Eco</i> RI, <i>Kpn</i> I, <i>Stu</i> I	Fa. Life Technologies
Weitere Enzyme	T4-Ligase, DNase, RNase A, RNase H, RNase T, Terminale Transferase	

Kits

RNA-Isolierung	QuickPrep [®] micro mRNA Purification Kit	Fa. Amersham Biosciences
DNA-Isolierung und Reinigung	Concert [™] Rapid Plasmid Miniprep System Concert [™] Rapid Gel Extraktion System Mini Elute Gel Extraktion Kit Nucleospin [®] E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	Fa. Life Technologies Fa. Life Technologies Fa. Qiagen Fa. Peqlab

2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstämme

<i>E.coli</i>	relevante Eigenschaften
K12 [®] DH 5α	<i>F'</i> $\phi 80\delta lacZ \Delta M15$ <i>end A1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk⁻mk⁺</i>) <i>supE44</i> <i>thi-1</i> λ <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>) <i>deoR</i>
JM 109	<i>e14</i> (<i>McrA⁻</i>) <i>recA1</i> <i>endA</i> <i>gyrA96</i> <i>th-1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk⁻mk⁺</i>) <i>supE44</i> <i>relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) [<i>F'</i> <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lac^gZ</i> $\Delta M15$
NM 522	<i>hsd</i> $\Delta 5\Delta$ (<i>lac-pro</i>) [<i>F'</i> <i>lacIqZ</i> Δ <i>M15</i> <i>pro⁺</i>]
BL 21	<i>F⁻</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i>

Vektoren

Plasmid	Quelle
pBlueskript II KS(-)	Stratagene
pBlueskript II T	selbst erstellt
p-GEM-T easy	Promega
p-GEX-G	selbst erstellt
pCR II-TOPO	Invitrogen

2.1.6 Nukleotide

SMART-RACE; 5'-RACE und Vektor Primer

SMART II	5'-aag cag tgg taa caa cgc aga gta cgc ggg-3'
5'-CDS	5'-(t) ₂₅ N ₁ N-3'
3'-CDS	5'-aag cag tgg taa caa cgc aga gta c(t) ₃₀ N ₁ N-3'
RACE-short	5'-cta ata cga ctc act ata ggg c-3'
RACE-long	5'-cta ata cga ctc act ata ggg caa gca gtg gta aca acg cag agt-3'
RACE-nested	5'-aag cag tgg taa caa cgc aga gt-3'
AAP	5'-ggc cac gcg tcg agt acg ggi igg gii ggg iig-3'
AUAP	5'-ggc cac gcg tcg act agt ac-3'
M13 universal	5'-acg acg ttg taa aac gac ggc cag-3'
M13 reverse	5'-ttc aca cag gaa aca gct atg acc-3'
T7	5'-gaa ttg taa tac gac tca cta tag-3'
SP6	5'-gat tta ggt gac act ata gaa tac-3'
5' pGEX seq. Primer	5'-ggg ctg gca agc cac gtt tgg t-3'
3' pGEX seq. Primer	5'-ccg gga gct gca tgt gtc aga gg-3'

Die 3'CDS und 5'CDS Primer besitzen zwei variable Basen (N₁N). Dadurch können sie spezifischer mit dem Anfang des Poly(A)-Restes der mRNA hybridisieren (Liang et al., 1993).

Degenerierte Primer für PKS

pd 1 sense	5'-gci at(act) aa(ag) ga(ag) tgg ggi ca-3'
dp 1 sense	5'-aci aa(ag) gci at(act) aa(ag) ga(ag) tgg ggi ca-3'
pd 2 sense	5'-atg atg ta(ct) ca(ag) ca(ag) ggi tg-3'
dp 2 sense	5'-atg atg ta(ct) ca(ag) ca(ag) ggi tg(ct) tt(ct) gc-3'
pd 3 anti	5'-cci cci gg(ag) tgi gc(agt) atc c-3'
dp 3 anti	5'-cci cci gg(ag) tgi gc(agt) atc ca-3'
pd 4 anti	5'-aai cc(ag) aai a(ag)i aci ccc c-3'
dp 4 anti	5'-gic c(gt)a aic c(ag)a aia (ag)ia cic ccc a-3'
APS-dp2-anti	5'-agi at(ct) tci c(gt)(ag) cti gci t(gt)i (ag)t-3'
APS-dp3-sense	5'-(ac)gi gti atg (gct)ti ta(ct) (ac)ai (ct)(at)i ggi-3'
APS-dp4-anti	5'-(agt)at (ag)aa (agc)a(at) iac i(gc)(at) igc i(gc)(at) i(gc)(act)-3'
APS-dp7-sense	5'-agg tic cia agc tig gia ag-3'

Primer für Isobutyrophenon-Synthase

APS-160403/1 anti	5'-ggc tga tac gag ctg gaa gag tg-3'
APS-160403/2 anti	5'-tcg agt acc ggg tcg ggg tc-3'
APS 020903 anti	5'-agc gcc tgc ccg acc atg ga-3'
H.c.APS 5 sense	5'-gcc gtc acc ttc cgc ggt c-3'
H.c.APS 6 sense	5'-cag gcg ctc ttt gga gat gga gc-3'
H.c.APS 7 anti	5'-caa aat ggc ggg ccc acc cg-3'
APS 60103/1 anti	
APS 60103/2 anti	
H.c(p). gsp 1/1 anti	5'-cca gct tgg cct cca cct a-3'
3'Exp APS anti (express. Primer)	5'-ggg gta ccc tag gcg gaa acg gcc tgc-3'
H.c. 22501-1 anti	5'-gca ggt cga cca tat ggg aga-3'
H.c. 22501-2 anti	5'-cac aca aca tac gag ccc gga-3'
H.c. 100401-1 anti	5'-aat tca tat cac cga cat aat taa aag aaa ct-3'
H.c. 100401-2 anti	5'-cca tgt tcc cgt act cgc tt-3'
H.c. 050601 GSP4 anti	5'-ggg tgt cgc ctt ctc ctc-3'
H.c. GSP2 070201 anti	5'-gct gtg gaa tgt cat gtc ggt att ctc-3'
H.c. GSP1 070201 sense	5'-tat ctc caa gga cct cgc cgg ag-3'
VPS Hum. sense	5'-cct cgg aga aac att tgg att gct tg-3'
VPS Hum. anti	5'-ctc gct cag cat ttc acg aga cg-3'

Primer für Benzophenon-Synthase

H.c.BPS-GSP1/2 anti	5'-tgg cgg gcg tcg agg gag-3'
BPS 2 Forw.	5'-ctc aac cgc acc gtc agg c-3'
S6	5'-gat aac atc gcc gcc gtc atg gag-3'
BPS(5') rev.	5'-ggg aga agt gcc tct tcc taa tat gag-3'
BPS(3') sense	5'-gat caa gga cga gaa cct tgt ggc-3'

H.c.BPS-GSP2 anti	5'-gtc tca agg atc ctc tgg cg-3'
H.p.BPS100203 sense	5'-aca gcg agc aca tga ccg ag-3'
BPS 100303/1 sense	5'-gac gcc cgc cag agg atc ct-3'
BPS 100303/2 sense	5'-gcg ccc aac gag tcc cac ct-3'
3bps2-H.c. (express. Primer)	5'-ggg gta cct cac tgg agg atg ggg aca ccc t-3'
3bps-2 (express. Primer)	5'-ggg gta cct cac tgg aga att ggg aca ctc tgg-3'
5hbps2 (express. Primer)	5'-atg gcc ccg gcg atg gag tac tca ac-3'

Primer für Chalcon-Synthase

H.c.CHS-GSP1anti	5'-gag aag gtg cca tgt aag cac ac-3'
H.c.CHS-GSP1sense	5'-ccg agc tca agg aga agt acc a-3'
H.c.CHS-GSP2 anti	5'-tcc aag att gct ggg ccg c-3'
H.p.CHS100203sense	5'-aca tgc ccg ggg ctg act a-3'
H.p.CHS100203anti	5'-gac tct tct caa cgt tct teg a-3'
CHS(5') rev.	5'-gcg ttg gaa ctt ctc ctt gag etc-3'
CHS(3')sense	5'-gag gcc ttc aaa cca ttg ggc att-3'
3hbp-H.p. (express. Primer)	5'-ggg gta ccc tag tta ata tgc gac act gtg aag gac-3'
3hbp-070102 (express. Primer)	5'-ggg gta ccc tag tta atg gcg aca ctg tga agg ac-3'
5hbp-070102 (express. Primer)	5'-atg gtg acc gtg gaa gaa gtc agg-3'

2.2 Pflanzenmaterial

2.2.1 Pflanzengewebekulturen

Die in dieser Arbeit verwendeten Kalluskulturen standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Zellsuspensionskulturen wurden selbst angelegt und auf zwei verschiedenen Medien kultiviert.

2.2.1.1 Anlegen einer Zellsuspensionskultur

Ungefähr 1 g Zellen einer Kalluskultur wurden unter sterilen Bedingungen in 50 ml Flüssigmedium im 250 ml Erlenmeyerkolben transferiert.

2.2.1.2 Kultivierung von Kallus- und Zellsuspensionskulturen

Die Kulturen auf Festmedien wurden unter Dauerlicht auf LS-Medium kultiviert. Alle drei Wochen wurde ein Teil der Zellmasse unter sterilen Bedingungen auf frisches Festmedium transferiert.

Alle Zellsuspensionen wurden auf einem Schüttler bei konstanter Temperatur von 25 °C und im Dunkeln kultiviert. Falls keine definierte Einwaage nötig war, wurden die Zellkulturen im Abstand von 7 Tagen durch einfaches Verteilen eines Kolbensenhalts auf zwei bis drei neue Kolben mit je 50 ml frischem Flüssigmedium weiterkultiviert.

Für Wachstumskinetiken und Enzymansätze wurden die Zellen abgenutscht. 4 g Ausgangsmasse wurden in neues Nährmedium eingewogen. Diese Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.2 Intakte Pflanzen

Hypericum perforatum-Pflanzen wurden im Arzneipflanzengarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig gesammelt.

2.3 Geräte

Waagen	Analysen- und Feinwaage	Sartorius
Wasserbad	Typ 3041	Kottermann
	Exatherm U3	Julabo
Heizblock	Dri-Block DB 3D	Techne
Inkubator	HT	Infors
Zentrifugen	Universal 32R	Hettich
	Biofuge 13	Heraeus Sepatech
HPLC	1525 Binary HPLC Pump	Waters
	2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters
	Breeze GBC Software	Waters
FPLC	Biologic-System	Bio Rad
	Controller	Bio Rad
	Fraktionensammler 2128	Bio Rad
Photometer	Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech

Spannungsgeber	Standard Power Pack P25	Biometra
	Power Pack 300	Bio Rad
Elektrophorese	DNA: Sub Cell-GT	Bio Rad
	Wide-Mini-Sub Cell GT	
	Mini-Sub Cell GT	
	Protein-Kammer	Biometra; Bio Rad
Vakuumkonzentrator	Genelac SF 50	Biometra
Geldokumentation	Multimage TM Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
pH-Meter	Digital pH Meter 325	WTW (Wissenschaftlich- Technische-Werkstätten)
Autoklavieren	Vapoklav	Sterilco
Reinluft	LaminAir HLB 2472	Heraeus
Gefriertrockner	Alpha	Christ
Reinstwasser	Milli-Q Reagent Water	Millipore

3. Methoden

3.1 Analytische und biochemische Arbeiten

3.1.1 Charakterisierung von pflanzlichen Zellkulturen

3.1.1.1 Frisch und Trockengewicht

Das Wachstum von *Hypericum calycinum*-Zellkulturen in BDS-Flüssigmedium im Dunkeln wurde charakterisiert.

Eine Reihe von Kolben mit 50 ml Medium wurde mit 3 g Zellmasse angeimpft. Vom 1. bis 12. (bzw. 14.) Tag wurden die Zellen eines Kolbens immer zur gleichen Tageszeit durch Vakuumfiltration abgeerntet und ihr Frischgewicht bestimmt. Für die Trockengewichtsbestimmung wurde 1 g Zellen auf einer austarierten Aluminiumfolie bei 120 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dann wurde der Wert auf das Gesamt-Frischgewicht hochgerechnet.

3.1.1.2 Gehalt an Hyperforinen

Drei g Pflanzenzellen wurden im Mörser mit 3 ml Chloroform oder Dichlormethan nach Zugabe von Seesand 5 min auf Eis extrahiert. Der Extrakt wurde bei 10000 rpm für 10 min abzentrifugiert und der Überstand im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Methanol aufgenommen und sein Hyperforin- und Adhyperforingehalt mittels HPLC (3.1.5) quantitativ bestimmt.

Als interner Standard diente die hyperforinhaltige Referenz. Zu einer Portion von 3 g Zellen wurden 10 µg Hyperforin zugegeben und die Extraktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Ein Teil des in Methanol aufgenommenen Extraktes wurde analysiert.

3.1.1.3 Fütterung von Hyperforin-Vorstufen

Zur Untersuchung des Einbaus von potenziellen Vorstufen für Hyperforin-Derivate wurden 3 Tage alten Zellkulturen 20 µg Trihydroxyacetophenon bzw. 40 µg Buttersäure zugegeben. Nach weiteren 3 Tagen Kultivierung wurden 5 g Zellmaterial mit Dichlormethan extrahiert und die Inhaltsstoffe mittels HPLC analysiert.

3.1.2 Synthese der Referenzsubstanz Phlorisobutyrophenon

Um das Produkt der enzymatisch katalysierten Kondensation von Isobutyryl-CoA und Malonyl-CoA identifizieren zu können, wurde Phlorisobutyrophenon (2-methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanon) nach der Methode von van Klink et al. (1999) synthetisiert. Hierzu wurden zunächst 2 g (12,35 mmol) Phloroglucin über Nacht bei 120 °C getrocknet. Trockenes AlCl_3 (4 g) wurde zu 15 ml POCl_3 unter Rühren auf Eis zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Phloroglucin und 1,1 g (12,35 mmol) Isobuttersäure (2-Methylpropionsäure) gestartet. Die Menge von Isobuttersäure ist von entscheidender Bedeutung, da mono-, di-, und triacylierte Derivate gebildet werden. Liegen Isobuttersäure und Phloroglucin in äquimolaren Konzentrationen vor, wird bevorzugt die monoacylierte Verbindung synthetisiert.

Alle Reaktionsschritte wurden unter Stickstoff-Schutzatmosphäre durchgeführt. Zunächst verlief die Reaktion 8 h bei 0 °C, danach wurde die Temperatur auf ca. 6 °C erhöht und die Synthese unter Rühren für weitere 40 h fortgesetzt.

3.1.2.1 Aufreinigung des Syntheseprodukts

Die Reaktionsmischung wurde 2x mit 100 ml Ether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden mit MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum im Rotationsverdampfer entfernt.

Das synthetische Produkt 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanon wurde aufgereinigt. Dazu wurde eine Glassäule mit Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm; Fa. VWR International) gefüllt und mit der mobilen Phase (Ethylether 70 % + Pentan 30 %) äquilibriert. Das Syntheseprodukt wurde auf die Säule geladen und mit oben genanntem Fließmittel eluiert. Es wurden 50 Fraktionen von ca. 10 ml gesammelt. Di- und Triacylprodukte wurden zuerst eluiert, gefolgt von dem Hauptprodukt.

Alle Fraktionen wurden einer DC unterzogen (3.1.3). Unter UV (254 nm) zeigte sich eine blaue Fluoreszenzzone mit R_f 0,85. Diejenigen Fraktionen, die reines Syntheseprodukt enthielten, wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Die Identität des 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanon wurde mittels HPLC, GC-MS und NMR bestätigt (3.1.5 und 3.1.6).

3.1.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die DC-Trennung wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien verwendet (Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm; Merck, Darmstadt). Die Proben und die Referenz wurden mit einer Glaskapillare auf die Platte aufgetragen und in einer DC-Kammer chromatographiert. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht.

Für die Identifizierung des Syntheseprodukts 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanon wurden folgende mobile Phasen verwendet:

1.	Dichlormethan 79 %	Ethylacetat 20 %	Essigsäure 1 %
2.	Dichlormethan 80 %	Ethylacetat 20 %	
3.	Dichlormethan 69 %	Ethylacetat 30 %	Essigsäure 1 %
4.	Dichlormethan 70 %	Ethylacetat 30 %	
5.	Diethylether 70 %	Pentan 30 %	

Die optimale Zusammensetzung der mobilen Phase wurde empirisch ermittelt.

Für die Identifizierung des isolierten Hyperforins und Adhyperforins wurden folgende Lösungsmittel gemischt:

Heptan 90 Teile	Isopropanol 15 Teile	Ameisensäure 0,5 Teile
-----------------	----------------------	------------------------

Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die Auftrennung der mit [2-¹⁴C] Malonyl-CoA markierten Inkubationsansätze war:

Chloroform 65 Teile	Methanol 25 Teile	Wasser 4 Teile
---------------------	-------------------	----------------

3.1.4 UV-Spektroskopie

Für die Analyse der isolierten Naturstoffe aus den pflanzlichen Zellkulturen wurden UV-Spektren im Bereich von 200 bis 400 nm aufgenommen. Es wurde in Küvetten aus Quarzglas Suprasil[®] (Hellma) gemessen.

3.1.5 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

3.1.5.1 Instrumentierung

Pumpe: Waters 1525 Binary HPLC Pump

Detektor: Waters 2487

Software: Waters Breeze GPC

Säulen: Nukleosil C₁₈ 100-5 (25 x 0,4 cm); Fa. Macherey&Nagel

Symmetry C₁₈ (5 µm, 15 x 0,46 cm); Fa. Waters

3.1.5.2 Fließmittel (Mobile Phase)

Zum HPLC-Nachweis von Hyperforin und Adhyperforin in den Zellkulturextrakten wurde ein isokratischer Gradient eingesetzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Hier wurden Reinstwasser 15 % und Methanol (für HPLC) 85 % oder Reinstwasser 14 %, Methanol 85 % und Phosphorsäure 1 % gemischt. Die optimale Zusammensetzung der mobilen Phase wurde empirisch ermittelt.

Zur HPLC-Analyse der enzymatischen Produkte wurde ein binärer Gradient verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min bzw. 0,5 ml/min. Die Zusammensetzung des Elutionsgemisches änderte sich innerhalb der angegebenen Zeitintervalle.

Gradient	Zeit [min]	Methanol - Anteil [%]	Wasser -Anteil [%]	Wellenlänge [nm]
CHS	0	30	70	285
	3	30	70	
	30	70	30	
	33	70	30	
	36	100	0	
	39	100	0	
	41	30	70	
	45	30	70	
BUS	0	20	80	288
	3	20	80	
	23	70	30	
	30	100	0	
	35	100	0	
	40	20	80	
	45	20	80	
BPS	0	20	80	306
	3	20	80	

	17	50	50	
	23	100	0	
	25	100	0	
	28	20	80	
	34	20	80	
Polyketid-Synthasen	0	40	60	306
	3	40	60	286
	17	70	30	
	18	70	30	
	23	80	20	
	25	100	0	
	28	100	0	
	30	40	60	
	35	40	60	
Extrakte	0	70	30	275
	2	70	30	
	16	80	20	
	20	80	20	
	25	100	0	
	27	100	0	
	30	70	30	

3.1.6 GC-MS – Analytik

3.1.6.1 Instrumentierung

Vorsäule: 2 m x 0,32 mm fused silica, desaktiviert (Phenomenex)

Trennsäule: 30 m x 0,32 mm ZB1 (Phenomenex)

Injektionsvolumen: 1 µl

Injektor und transfer line: 280 °C

Temperaturprogramm: 100 °C (3 min) -300 °C (5 min) bei 10 °C min⁻¹

Splitverhältnis: 1:20

Gas flow: 1,6 ml/min He

Die Kapillarsäule wurde direkt mit einem Triple-Quadrupole Massenspektrometer Finnigan TSQ 700 gekoppelt.

3.1.6.2 Probenbereitung

Das Syntheseprodukt 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanon oder das Produkt einer enzymatischen Reaktion wurden nach der Standardmethode acetyliert. Lösungsmittel

wurde unter Stickstoff entfernt und das getrocknete Produkt (etwa 1 mg) in 10 µl Pyridin und 10 µl Essigsäureanhydrid gelöst. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Methanol gestoppt und die Proben wurden mittels GC-MS analysiert.

3.1.7 HPLC-MS

3.1.7.1 Instrumentierung

MS: ThermoFinnigan LCQ (Egelsbach)

HPLC: Gold HPLC System (Beckmann Coulter, Unterschleißheim)

Säule: Nucleosil C₁₈ 100-5 (25 x 0,4 cm)

Mobile Phase: Methanol 85 %, Wasser 15 %

3.1.7.2 Probenbereitung

Der Extrakt aus *H. calycinum*-Zellkulturen (3.1.1.2) wurde zur Trockne eingengt und der Rückstand in Methanol gelöst. Jeweils 100 µl des Extrakts wurden analysiert.

3.1.8 Fast protein liquid chromatography (FPLC)

3.1.8.1 Anionenaustauschchromatographie

Ionentausch ist eine der meist genutzten Methoden für die Fraktionierung biologischer Substanzen. Biomoleküle mit unterschiedlicher Ladung können auf diesem Wege voneinander getrennt werden. Zur Auftrennung der drei PKS (BUS, BPS, CHS) wurde eine DEAE-Säule der Firma Amersham Biosciences (1 ml) eingesetzt. Der Zellfreie Extrakt (3.1.10.1 und 3.1.10.2) wurde auf die mit 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,5 äquilibrierte Säule aufgetragen. Durch steigende KCl-Konzentration (linearer Gradient) wurden die Proteine von der Säule eluiert. Es wurden 20 Fraktionen je 1 ml gesammelt.

Jede zweite Fraktion wurde anschließend mit drei verschiedenen Substraten (Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA) nach der Standardmethode (3.1.10.5) inkubiert. Die Inkubationsprodukte wurden mittels HPLC (3.1.5) analysiert und mittels Standardlösungen von authentischen Referenzsubstanzen quantifiziert.

FPLC-Programm für Ionenaustausch-Chromatographie:

Schritt	Zeit [min]	Funktion	Puffer		Volumen/Fluss
1	13,0	collect fractions within 1 time window ending at 33 ml			
2	0,0	set zero baseline	UV detector		
3	0,0	isocratic flow	A-buffer 2	100 %	vol. 4,0 ml
			buffer B	0 %	flow 2 ml/min
4	4,0	load/inject sample	load sample		vol. 3,0 ml
			static loop	auto inject valve	0,5 ml/min
5	7,0	isocratic flow	A-buffer 2	100 %	vol. 6 ml
			buffer B	0 %	2 ml/min
6	13,0	linear gradient	A-buffer 2	100 %→0 %	vol. 20 ml
			buffer B	0 %→100 %	2 ml/min
7	33,0	isocratic flow	A-buffer 2	0 %	vol. 4,0 ml
			buffer B	100 %	2 ml/min
8	37,0	isocratic flow	A-buffer 2	100 %	vol. 6 ml
			buffer B	0 %	2 ml/min
	43	end of protocol			

3.1.8.2 Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf spezifischen Interaktionen zwischen dem zu reinigenden Protein und der Matrix, so dass ein überexprimiertes Protein leicht von den Fremdproteinen befreit wird. Dank dieser Spezifität erlaubt die Affinitätschromatographie eine hundertfache Reinigung in einem Schritt. Zudem hat sie wie Ionenaustausch einen Konzentrierenden Effekt, d.h. ausgehend von verdünnten Lösungen liefert sie kleine Volumina an konzentrierten Proteinen.

Die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurde an einer Säule GStapTM (1 ml; Amersham Biosciences) durchgeführt. Der bakterielle Rohextrakt wurde auf die mit Kaliumphosphat-Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen. In den ersten 20 Minuten wurden alle unspezifischen Proteine mit Kaliumphosphat- und PBS-Puffer (2.1.3) entfernt. Danach wurde das gebundene GST-Fusionsprotein mit einem Lineargradienten des Elutionspuffers (2.1.3) eluiert. Zehn 0,5 ml-Faktionen wurden gesammelt. Die Proteinmenge wurde nach Bradford (3.1.10.3) ermittelt und die Reinheit des Proteins auf einem SDS Gel überprüft.

FPLC-Programm für Affinitätschromatographie:

Schritt	Zeit [min]	Funktion	Puffer	Volumen/Fluss
1	29,0	collect fractions within 1 time window ending at 33ml		
2	0,0	set zero baseline	UV detector	
3	0,0	isocratic flow	A-buffer 2 100 % buffer B 0 %	vol. 3,0 ml flow 1 ml/min
4	3,0	load/inject sample	load M 260L static loop auto inject valve	vol. 3,0 ml 0,3 ml/min
5	6,0	isocratic flow	A-buffer 2 100 % buffer B 0 %	vol. 10 ml 1 ml/min
6	16,0	isocratic flow	A-buffer 4 100 % buffer B 0 %	vol. 10 ml 1 ml/min
7	26,0	isocratic flow	A-buffer 2 100 % buffer B 0 %	vol. 3,0 ml 1 ml/min
8	29,0	isocratic flow	A-buffer 2 0 % buffer B 100 %	vol. 5 ml 1 ml/min
9	34,0	isocratic flow	A-buffer 2 100 % buffer B 0 %	vol. 5 ml 1 ml/min
	39,0	end of protocol		

3.1.9 Radioscan-Analyse

Die enzymatischen Produkte, die in Gegenwart von radioaktiv markiertem Malonyl-CoA gebildet wurden, wurden nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung mit Hilfe des Radioscanners Rita (Fa. Raytest) detektiert und quantifiziert. Jeder Inkubationsansatz (3.1.10.5) enthielt [2-¹⁴C] Malonyl-CoA (0,93 kBq). Die mit Ethylacetat extrahierten Produkte wurden im Vakuum bis zur Trockne eingengt, in 50 µl Ethylacetat aufgenommen, mittels DC (Kieselgel 60 F₂₅₄) getrennt (3.1.3) und anschließend analysiert.

3.1.10 Enzymologische Untersuchungen

3.1.10.1 Gewinnung von Rohextrakt

Die Pflanzenzellen wurden nach 12 Stunden, sowie 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen abgeerntet. Um phenolische Verbindungen zu binden, die Proteine inaktivieren können, wurden 4,0 g Zellen mit 0,4 g Polyclar[®] AT versetzt. Nach Zugabe von Seesand wurden die Zellen in einem Mörser in 4,0 ml Kaliumphosphat-Puffer, pH 7-7,5 (2.1.3) 15 min auf Eis homogenisiert und anschließend 10 min bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand war der zellfreie Enzymrohextrakt.

3.1.10.2 Entfernung von niedermolekularen Verbindungen

Eine HPLC-Analyse von Enzyminkubationen wird durch die Gegenwart von niedermolekularen Stoffen erschwert. Deren nahezu vollständige Abtrennung aus einem Proteinextrakt wurde durch den Einsatz von PD₁₀-Säulen (Amersham Biosciences) nach den Angaben des Herstellers erreicht. Die Säule wurde mit 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (oder Tris-Puffer), pH 7-7,5 äquilibriert. Anschließend wurden 2,5 ml des Rohextrakts auf die Säule aufgetragen. Die hochmolekulare Fraktion wurde mit 3,5 ml des gleichen Puffers eluiert.

3.1.10.3 Bestimmung von Proteingehalten

Protein-Konzentrationen wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Als Standard für die Erstellung einer Kalibriergeraden diente Rinderserumalbumin (BSA). Stammlösungen, die 1-10 µg BSA enthielten, wurden mit 0,9 ml frisch hergestellter Bradford-Lösung versetzt und auf 1 ml mit Wasser aufgefüllt. Alle Proben wurden vorsichtig gemischt und nach 10 min bei 595 nm gegen 0,9 ml Bradford-Lösung + 0,1 ml Wasser vermessen. Die Kalibriergerade wurde aus Messwerten einer seriellen Verdünnung mit BSA durch lineare Regression ermittelt. Lösungen unbekannten Proteingehalts wurden ebenfalls mit 0,9 ml Bradford-Lösung gemischt, auf 1 ml mit Wasser aufgefüllt und bei 595 nm vermessen. Der Proteingehalt wurde aus den Extinktionsmesswerten mittels der Geradengleichung der Kalibriergeraden ermittelt.

3.1.10.4 Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung ist eine der gebräuchlichsten Methoden um Proteine, deren biologische Aktivität erhalten bleiben soll, aus einer Lösung aufzukonzentrieren. Proteine in Lösung bilden mit ihren geladenen Gruppen Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen. Durch Zugabe von stark geladenen Ionen (NH_4^+ , SO_4^-) hydratisieren die Salzionen und entziehen den Proteinen die Hydrathülle. Die Löslichkeit der Proteine wird vermindert, was zur Präzipitation führt.

Zu einem aus den Zellkulturen gewonnenen Proteinextrakt wurden 56 g Ammoniumsulfat/Liter für 10 %-Sättigung langsam unter Rühren auf Eis zugegeben. Nach 30 min wurde der Extrakt für 30 min bei 9000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das gefällte Protein wurde in Tris Puffer (2.1.3) gelöst. Danach wurden die Salze mittels einer PD₁₀-Säule entfernt (3.1.10.2) und das Protein für weitere Untersuchungen eingesetzt.

3.1.10.5 Polyketid-Synthase-Ansätze

Alle Bestandteile eines Inkubationsansatzes (Tab. 3-1) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 30 bzw. 35 °C 60 bzw. 20 min inkubiert. Eine Probe mit denaturiertem Enzym diente als negative Kontrolle. Dazu wurde die Enzymlösung vor Zugabe der restlichen Reaktionsbestandteile 10 min gekocht.

Nach Inkubation wurde der Enzymansatz mit gleichem Volumen Ethylacetat extrahiert und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erzielen. Die Ethylacetatphase wurde im Vakuum eingedunstet. Für die HPLC-Analyse (3.1.5) wurde der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen.

Tab. 3-1: Zusammensetzung von PKS-Ansätzen

	Stammlsg.	Menge der Stammlsg.	Endkonzentration
Isobutyrophenon-Synthase			
Isobutyryl-CoA	0,47 mM	10 µl	18,1 µM
Malonyl-CoA	0,47 mM	10 µl	18,1 µM
DTT	1 mM	5 µl	20 µM
Enzym (Extrakt)			2 µg oder 20-50 µl Rohextrakt
Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0	0,1 M	ad 250 µl	
Benzophenon-Synthase			
Benzoyl-CoA	0,23 mM	10 µl	9,9 µM
Malonyl-CoA	0,47 mM	10 µl	18,1 µM
DTT	1 mM	5 µl	20 µM
Enzym (Extrakt)			2 µg oder 20-50 µl Rohextrakt
Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0	0,1 M	ad 250 µl	
Chalkon-Synthase			
p-Cumaroyl-CoA	66,7 µM	20 µl	7,6 µM
Malonyl-CoA	0,47 mM	10 µl	18,1 µM
DTT	1 mM	5 µl	20 µM
Enzym (Extrakt)			2 µg oder 20-50 µl Rohextrakt
Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0	0,1 M	ad 250 µl	

3.1.10.6 Bestimmung von pH- und Temperatur-Optima

Die Enzymsätze (3.1.10.5) wurden im Kaliumphosphat-Puffer pH 5,5 bis 9,0 für 20 min bei 30 °C inkubiert. Für jede Inkubation wurden 2 µg Enzym eingesetzt. Beim ermittelten optimalen pH-Wert wurde eine weitere Enzymsatz-Serie bei verschiedenen Temperaturen zwischen 15 °C und 45 °C inkubiert. Mittels HPLC-Analyse (3.1.5) der Produktmengen wurde das Temperaturoptimum für jedes rekombinante Enzym bestimmt.

3.1.10.7 DTT-Optimum

Um die optimale DTT-Konzentration für die Enzymaktivitäten zu bestimmen, wurden zu Inkubationsansätzen (3.1.10.5) 0; 5; 10; 50; 100 bzw. 200 µM DTT zugegeben. Zusätzlich enthielt jeder Ansatz [2-¹⁴C] Malonyl-CoA (0,93 kBq). Die Inkubation wurde wie in Kapitel 3.1.10.5 durchgeführt. Die extrahierten Produkte wurden mittels DC (Kieselgel 60 F₂₅₄) getrennt (3.1.3). Detektiert und quantifiziert wurden die Produkte mit Hilfe des Radioscanners Rita (Fa. Raytest).

3.1.11 Charakterisierung der überexprimierten Proteine

3.1.11.1 Untersuchung der Substratspezifität

Bei optimalem pH-Wert und optimaler Temperatur wurde 1 µg des jeweiligen rekombinanten Proteins mit verschiedenen Starter-Substraten inkubiert. Als Kettenverlängerer diente [2-¹⁴C] markierter Malonyl-CoA (0,93 kBq).

Folgende Substrate wurden eingesetzt: p-Cumaroyl-CoA, Cinnamoyl-CoA, Benzoyl-CoA, o-Hydroxy-benzoyl-CoA, m-Hydroxy-benzoyl-CoA, p-Hydroxy-benzoyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Butyryl-CoA, Isovaleryl-CoA, Hexanoyl-CoA, Octanoyl-CoA und Acetyl-CoA.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die Extrakte bis zur Trockne eingengt. Die Rückstände wurden in je 50 µl Ethylacetat aufgenommen. Für die Analyse wurden die organischen Extrakte auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte aufgetragen und mit folgendem Laufmittel aufgetrennt: Chloroform 65 Teile, Methanol 25 Teile, Wasser 4 Teile.

Parallel zu den radioaktiven Ansätzen wurden die Starter-Substrate auch mit nicht-markiertem Malonyl-CoA inkubiert und die Ansätze mittels HPLC analysiert.

3.1.11.2 Bestimmung von kinetischen Daten

Die K_m und K_{cat} Werte für die bevorzugten Substrate jedes überexprimierten Enzyms wurden ermittelt. Dazu wurden 2 µg Protein mit verschiedenen Substrat-Konzentrationen im pH- und Temperatur-Optimum 20 min inkubiert. Die Konzentrationen lagen zwischen $0,2-5 \times K_m$. Das zweite Substrat wurde zu jeder Reaktion in der Sättigung zugegeben. Die quantitative Analyse der mit zunehmender Substrat-Konzentration ebenfalls zunehmenden Produkt-Konzentration erfolgte mittels HPLC (3.1.5). Die K_m -Werte wurden mit dem Programm „Sigma-Plot Swift 1000“ berechnet.

3.1.12 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe dieser Methode können Proteine nach ihrer Größe getrennt und ihr Untereinheiten-Molekulargewicht bestimmt werden (Laemmli, 1970).

3.1.12.1 Herstellung des Gels und Probenvorbereitung

Die Elektrophorese wurde in einer Kammer für vertikale Plattengele durchgeführt. Zuerst wurde das Trenngel hergestellt (2.1.3). 1,5 M Tris-HCl Puffer, 10 % SDS und bidest. Wasser wurden gemischt. Nach Zugabe von 0,1 ml des 10 % APS und 5 µl TEMED wurde die Lösung zwischen zwei Glasplatten ausgegossen und mit Wasser überschichtet. Die anschließende Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur. Nach vollständigem Auspolymerisieren wurde das überschüssige Wasser entfernt und das Trenngel mit dem frisch hergestellten Sammelgel (0,5 M Tris-HCl, 10 % SDS, 10 % APS, TEMED und bidest. Wasser) überschichtet. Der Taschenformer wurde eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde der Kamm entfernt und die Taschen wurden mit den Proteinproben (je 5 µg) beladen. Dazu wurden die Proteinlösungen mit 15 µl 1x Probenpuffer (enthält β -Mercaptoethanol) gemischt, auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt und für 10 min bei 90 °C denaturiert. In eine Tasche wurde der Größenmarker (MWG-Technologies; Invitrogen) gefüllt.

3.1.12.2 Elektrophorese und Detektion der Proteinbanden

Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer (2.1.3) gefüllt und an die Elektroden wurde Spannung angelegt. Die Wanderung der Proteine erfolgte bei 75 mA, 15 W und 200 V. Zur Detektion wurde das Trenngel ca. 60 min oder über Nacht in Coomassie-Lösung (2.1.3) gefärbt und anschließend für mehrere Stunden in der Entfärberlösung entfärbt. Dadurch wurden die getrennten Proteinbanden sichtbar gemacht.

3.1.12.3 Bestimmung des Molekulargewichts

Ist die Aminosäure-Sequenz eines Proteins nicht bekannt, so kann das Molekulargewicht der Untereinheiten eines Proteins durch SDS-PAGE bestimmt werden.

Falls die Aminosäure-Sequenz bekannt ist, kann das Molekulargewicht durch Addition der Molekulargewichte der einzelnen Aminosäuren errechnet werden. In dieser Arbeit wurde dafür das Programm "MegAlign" (DNASTAR) genutzt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Anzucht und Kultivierung von *E. coli*

Generell erfolgte die Anzucht von *E. coli* in LB-Medium (2.1.4). Für die Transformation wurde *E. coli* in SOC-Medium angezogen, zum Erhalt von Einzelkolonien auf festem LB-Medium ausplattiert und für Plasmidpräparationen über Nacht (16-18 h) in 5 ml LB Medium kultiviert. Für die Proteinüberexpression wurde *E. coli* in 100 ml LB Medium bei 37 °C auf einem Rundschüttler angezogen. Für die Proteinexpression wurde die Temperatur auf 25 °C herabgesetzt. Zur Selektion wurde den Medien das entsprechende Antibiotikum (2.1.4) zugesetzt.

3.2.2 Lagerung von Bakterienkulturen

Für die kurzfristige Lagerung wurden Kulturen auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum maximal 4 Wochen aufbewahrt. Die langfristige Lagerung erfolgte in Glycerinkulturen bei -80 °C. Dazu wurde einer Kultur in der logarithmischen Phase (5 ml LB-Medium, 8 h, 37 °C) 0,8 ml entnommen und mit 0,2 ml sterilem Glycerin (87 %) vermischt.

3.2.3 Messung der optischen Dichte (OD)

Das Bakterienwachstum wurde durch Messung der Trübung bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch bestimmt. Zum Null-Abgleich diente die jeweilige unbeimpfte Lösung. Dabei entspricht die Absorption bei $OD_{600} = 1$ einer Zellzahl von etwa 8×10^8 (Bertram und Gassen, 1991).

3.2.4 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Primer (2.1.6) wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert. Die für die Fragmentsuche eingesetzten degenerierten Primer und die anschließend verwendeten genspezifischen Primer hatten in der Regel eine Länge von 18-25 Basenpaaren und einen Schmelzpunkt von 55-65 °C. Der GC-Gehalt betrug, wenn möglich, 40-60 %.

3.2.4.1 Einbau von Restriktionsschnittstellen in Primer

Schon bei der Konstruktion der Primer wurden Restriktionsschnittstellen eingebaut. Bei der Klonierung in Vektoren, die für ein Fusionsprotein kodieren, ist auf die Einhaltung des Leserasters zu achten. Die Schnittstellen müssen im Primer so lokalisiert sein, dass es nach der Ligation des Inserts in den Vektor an der Fusionsstelle zu einem rastergenauen Übergang des Triplettkodes kommt. Die veränderten Hybridisierungsbedingungen von Primer und Matrize müssen dabei berücksichtigt werden.

3.2.5 Isolierung von poly(A⁺)-RNA

Am Tag der maximalen enzymatischen Aktivitäten wurde aus den *Hypericum calycinum*-Zellkulturen und *Hypericum perforatum*-Knospen sowie Früchten mRNA isoliert. Dazu wurde das QuickPrep[®] Micro mRNA-Isolationskit der Firma Amersham Biosciences verwendet. Die Gewinnung erfolgte nach den Herstellerangaben.

Das Prinzip dieser Methode ist die Tensidlyse der pflanzlichen Zellen unter Hemmung der RNasen durch Guanidiniumthiocyanat. Die aus den Zellen gewonnene poly(A⁺)-RNA wird an eine Zellulose-oligo(dT)-Affinitätsmatrix gebunden. Nach mehreren Waschschritten mit Hoch- und Niedrigsalzlösungen wird die mRNA von der Matrix eluiert und durch Zugabe von Glykogen, Kaliumacetat und Ethanol gefällt. Die frisch gewonnene mRNA wurde in RNase-freiem Wasser aufgenommen und entweder direkt für RT-PCR verwendet (3.2.8 und 3.2.9) oder bei –80 °C für spätere Untersuchungen gelagert.

3.2.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren ($c_{(NA)}$) wurde nach Sambrook et al. (1989) bestimmt, wobei die Absorption bei 260 nm photometrisch vermessen wurde.

$$c_{(NA)} = A_{260} \times \text{Abs.} \times \text{Verdünnung} \qquad A_{260}: \text{Absorptionskoeffizient}$$

Die Absorptionskoeffizienten für verschiedene Nukleinsäuren:

dsDNA	1,0 $A_{260} \sim 50 \mu\text{g/ml}$
ssDNA und RNA	1,0 $A_{260} \sim 33 \mu\text{g/ml}$
Oligonukleotide	1,0 $A_{260} \sim 20 \mu\text{g/ml}$

Bei 280 nm werden Proteine erfasst. Das Verhältnis von A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte deuten auf

Verunreinigungen (z.B. mit Proteinen) hin. Die Genauigkeit der Methode reicht bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 100 ng/ μ l.

3.2.7 Fällung von DNA

Die Präzipitation von DNA mit Ethanol oder Isopropanol diene sowohl der DNA-Konzentrierung als auch der weitgehenden Abtrennung niedermolekularer Bestandteile. DNA wurde mit 40 μ l Wasser, 5 μ l 3 M Natriumacetat-Lösung und 125 μ l Ethanol gefällt und für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde 2x mit je 300 μ l 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min bei 13000 rpm) und dann bei maximal 37 °C getrocknet.

3.2.8 cDNA Synthese

3.2.8.1 5'- und 3'-RACE mittels SMART-Verfahren

Für die cDNA-Erststrang-Synthese diene als Matrise poly(A⁺)-RNA.

Die Synthese der 3'-RACE-cDNA und der 5'-RACE-cDNA wurde analog dem SMART-RACE Verfahren der Firma Clontech durchgeführt. Folgende Komponenten wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt, 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis platziert.

3'-RACE-cDNA		5'-RACE-cDNA	
poly(A ⁺)-RNA	3 μ l	poly(A ⁺)-RNA	3 μ l
3'-CDS Primer	1 μ l	Smart II oligo Primer	2 μ l
10mM dNTP Mix	1 μ l	5'-CDS Primer	1 μ l
Nukleasen-freies Wasser ad	10 μ l	10mM dNTP Mix	1 μ l
		Nukleasen-freies Wasser ad	10 μ l

Danach wurden zu beiden Ansätzen folgende Komponenten zupipettiert:

5x Puffer für die Erststrang-Synthese	4 μ l
0,1 M DTT	2 μ l
Reverse Transkriptase	1 μ l
RNase-Inhibitor (40 Units/ μ l)	0,5 μ l
Nukleasen-freies Wasser	2,5 μ l

Erneut wurden die Ansätze diesmal bei 37 °C 50 min inkubiert. Bei der reversen Transkriptase handelte es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase Superscript II der

Fa. Life Technologies. Dieses aus dem Moloney Murine Leukemia Virus gewonnene Enzym (MMLV-RTase) wurde in *E. coli* exprimiert und zur Homogenität gereinigt. Seine RNase-Aktivität wurde durch Punktmutation in der H-Domäne unterbunden. Die RT-Reaktion wurde durch Erhöhung der Temperatur auf 80 °C für 10 min beendet.

Um die RNA vollständig zu entfernen, wurden 0,5 µl (1 Unit) *E. coli* RNase H und 0,5 µl (1 Unit) RNase T zugegeben und der komplette Ansatz wurde 20 min bei 37 °C inkubiert. Für GC-reiche und dadurch schwer zugängliche RNA wurde die reverse Transkriptase Thermoscript der Firma Invitrogen verwendet. Dieses Enzym katalysiert die reverse Transkription bei Temperaturen bis zu 60 °C. Für Standard-Reaktionen wurde die reverse Transkriptase der Firma Sigma verwendet. Dabei wurde die cDNA aus der RNA laut dem oben aufgeführten Reaktionsprotokoll synthetisiert.

Die gewonnenen cDNAs wurden für RACE-PCR eingesetzt oder für weitere Untersuchungen bei -20 °C gelagert.

3.2.8.2 Synthese von 5'-cDNA mittels Terminaler Transferase

Die reverse Transkription wurde wie unter 3.2.8.1 beschrieben durchgeführt. Als Oligonukleotid wurde ein oligo-dT Primer eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde mit einem DNA Purification Kit (Macherey&Nagel) aufgereinigt und in 50 µl 10 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 aufgenommen. Ein Aliquot davon (10 µl) wurde zusammen mit 6,5 µl Nuklease-freiem Wasser, 5 µl 5x Tailing-Puffer und 2,5 µl 2 mM dCTP für 2 min bei 94 °C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1 µl TdT Enzym (Terminale Transferase) 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann bei 65 °C für 10 min gestoppt. Der so gebildete oligo-dC Rest diente in der folgenden Reaktion als Bindungsstelle für einen oligo-dG Ankerprimer (AAP; AUAP).

3.2.9 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR)

Das Prinzip der PCR ist eine exponentielle enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonucleotid-Primern. Die Primer sind gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden. Als Matrize (template) für die PCR dienen genomische DNA, Plasmid-DNA und cDNA (revers transkribierte RNA). DNA-Polymerase fügt Nucleotide an die 3'-OH-Gruppe von Primern an und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen.

Eine Standard-PCR-Reaktion bestand aus:

10-500 ng Matrize
 2 µl Primer forward (sense) (10 µM)
 2 µl Primer reverse (antisense) (10 µM)
 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, komplettiert mit MgCl₂ oder Mg(SO₄)₂
 (polymeraseabhängig)
 1 µl Polymerase (1 U/µl)
 und bidest. Wasser ad 25 µl.

Für die Standard-Reaktionen wurde rekombinante oder native *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* verschiedener Hersteller eingesetzt. Ferner wurden korrekturlesende (proofreading) Polymerasen eingesetzt, die eine zusätzliche 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzen (*Pwo*-, *Pfu*-, *Pfx*-Polymerasen). Solche Polymerasen sind in der Lage, falsch eingebaute Basen zu korrigieren und die Fehlerrate wesentlich zu erniedrigen. Die mittels einer proofreading-Polymerase synthetisierte DNA wurde in einen Expressionsvektor kloniert.

Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnitts erfolgte in drei Schritten:

1. Denaturierung: Die DNA wird bei 94 °C 15-25 s in zwei Einzelstränge getrennt.
2. Annealing: Je nach Schmelztemperatur der Primer wird die Temperatur auf 40-65 °C für 25 s gesenkt (die Temperatur lag in der Regel 5 °C unter dem Schmelzpunkt der angewandten Primer).

Für die Berechnung der Temperatur gilt:

$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T})$. Die Formel ist allerdings nur für kurze Primer mit einer Länge um 20 Basen verwendbar. Die Schmelztemperatur hängt nicht nur von der Basenzusammensetzung, sondern auch von der Sequenz ab. Die genaue Temperatur wurde von der Fa. MWG ermittelt.

3. Extension: Bei 72 °C bzw. 68 °C wird der komplementäre DNA-Strang durch Verlängerung des Primers hergestellt. Allgemein gilt: Für 1000 bp reicht eine Elongationszeit von 1 min aus.

Der Zyklus wurde 25-30 x durchlaufen. Bei Verwendung der *Taq*-Polymerase erfolgte eine finale Extension für 10 min bei 72 °C.

Standardmäßig wurde die Hot-Start PCR durchgeführt, d.h. die *Taq*-Polymerase wurde nach einer anfänglichen zweiminütigen Denaturierung der Matrize zu dem Reaktionsansatz zugegeben. Falls eine Bakterienkolonie für sog. Insertcheck diente, wurde ein Klon von einer Agarplatte in der Reaktionsflüssigkeit suspendiert und vor dem ersten PCR-Zyklus 5 min auf 98 °C erhitzt. Erst danach wurde die *Taq*-Polymerase zugegeben.

Für eine möglichst hohe und spezifische Ausbeute wurden die PCR-Bedingungen für jede Matrize und jedes Primerpaar optimiert.

3.2.9.1 Touch-down PCR

Falls sich die Schmelztemperaturen eines Primerpaares unterschieden, oder nicht genau errechenbar waren, wurden manche DNA-Abschnitte im sog. Touch-down-PCR-Programm gewonnen. Hier wurde in den ersten 10 Zyklen pro Zyklus die annealing-Teperatur jeweils um 0,5 bzw. 1 °C gesenkt. Anschließend wurden bei der zuletzt erreichten Temperatur 20 Zyklen einprogrammiert.

3.2.9.2 Nested PCR

Mit der geschachtelten (nested) PCR können amplifizierte DNA-Fragmente genauer charakterisiert werden. Das Verfahren besteht aus zwei aufeinanderfolgenden PCR. Dabei dient das Produkt der ersten PCR als Matrize für die zweite Amplifikation. Sollte es bei der ersten PCR zur Amplifikation einer unspezifischen Sequenz gekommen sein, liefert die zweite PCR kein Produkt mehr, da die Primer nicht zu der Vorlage komplementär sind.

3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Elektrophorese in Agarosegelen. Zwischen dem Logarithmus der Länge des Fragments und der relativen Wanderungsdistanz besteht eine lineare Abhängigkeit.

Je nach erwarteter Größe der zu trennenden Fragmente variierte die Agarosekonzentration zwischen 0,5 und 2 %. Die Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst und kurz aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50-60 °C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/10 ml) versetzt und in eine Elektrophorese-Kammer mit eingesetztem Taschenformer gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Kamm entfernt und die Taschen wurden mit einem Gemisch aus 2 µl 6x Ladepuffer (zur Abschätzung der Lauflänge) und 10 µl DNA-Lösung beladen. Durch Verwendung eines Eichstandards mit DNA-Fragmenten bekannter Größe kann die Länge der DNA-Fragmente bestimmt werden. Die DNA wurde in TAE-Puffer bei ca. 120 V (die Spannung war gelabhängig) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt.

Aufgrund der Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA kann sie im UV-Licht detektiert werden.

3.2.10.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das zu isolierende Fragment wurde nach der Elektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe eines Gel-Extraktionskits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dazu wurden verschiedene Systeme der Firmen Qiagen, Gibco und Macherey&Nagel verwendet. Das Gelstück wird im 3-fachen Volumen Puffer bei 50 °C gelöst, an Silicagel gebunden und gewaschen. Anschließend wird die DNA mit Wasser oder Puffer von der Säule eluiert.

3.2.11 Herstellung eines T-Überhangvektors

Der dT-Überhang wird an ein glattes (blunt-end) Ende einer DNA Sequenz addiert (Holton und Graham, 1990). Zur Herstellung eines T-Überhangvektors wurden ca. 10 µg des Vektors pBluescript SK(-) oder des Vektors p-GEM mit dem Restriktionsenzym EcoRV für 12-16 h bei 37 °C inkubiert. Die geschnittene DNA wurde gefällt (3.2.7) und in 85 µl bidest. Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl Taq-Polymerasepuffer, 2 µl dT (100 µM) und 6 Units Taq-Polymerase zugegeben. Dieser Ansatz wurde für zwei Stunden bei 70 °C inkubiert. Das Syntheseprodukt wurde über eine Nucleospin[®] Säule (Fa. Macherey&Nagel) aufgereinigt und die DNA Konzentration bestimmt (3.2.6). Falls nötig, wurde das Plasmid mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt.

3.2.12 Restriktion mittels Typ-II-Endonukleasen

Die in die Gruppe II der Restriktionsendonukleasen eingeteilten Enzyme hydrolysieren die Phosphodiesterbindung der DNA meist innerhalb einer palindromischen Erkennungsequenz.

Die zu schneidende DNA, der optimale Puffer (laut Herstellerangaben) und die entsprechende Endonuklease wurden gemischt und beim Temperaturoptimum 2-4 h inkubiert. Falls die DNA mit mehreren Restriktionsenzymen zu schneiden war, wurde der Puffer gewählt, in dem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität aufwiesen.

Der Reaktionsansatz bestand aus ca. 500 ng DNA, 4 µl 10x Puffer, Restriktionsenzym und bidest. Wasser ad 40 µl.

3.2.13 Ligation mit der T4-DNA-Ligase

Bei einer Ligation wird die Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende geschlossen.

Für die Ligation mit einem T-Überhangvektor wird das gereinigte, mit *Taq*-DNA-Polymerase gewonnene PCR-Amplifikat eingesetzt. Die *Taq*-Polymerase hängt unspezifisch an das 3' Ende von PCR-Produkten einzelne Basen an, meistens ein Desoxyadenosin (dA). PCR-Amplifikate, die mit der *Taq*-Polymerase synthetisiert wurden, können so ohne vorausgehenden Restriktionsverdau in einen entsprechenden T-Überhangvektor ligiert werden. Die Ligation mit verschiedenen Vektoren erfolgte laut Herstellerangaben.

Für andere Ligationen wurden die Enden der DNA-Fragmente durch Restriktionsenzyme verdaut, so dass klebrige oder glatte Enden entstanden. Das Insert wurde im Überschuß mit entsprechendem Plasmid, Ligationspuffer und der T4-DNA-Ligase entweder 1 h bei Raumtemperatur oder 12-16 h bei 12 °C inkubiert. Das molare Verhältnis Insert : Vektor betrug dabei zwischen 3:1 und 10:1.

3.2.14 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli*

3.2.14.1 Herstellung kompetenter Zellen

Das Verfahren von Cohen et al. (1972) wurde angewendet. Eine *E. coli*-Kolonie wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum auf einem Inkubationsschüttler bei 37 °C angezogen. 1 ml dieser Vorkultur diente als Inokulum für 50 ml LB-Medium, das bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 unter den angegebenen Bedingungen weiterinkubiert wurde. Alle weiteren Schritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Nach Zentrifugation (4 °C, 10 min, 3500 rpm) wurde das Pellet in einer eiskalten 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen vorsichtig in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung mit 15 % Glycerin (w/v) resuspendiert und in 100 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.2.14.2 Transformation von *E. coli*

Pro Ansatz wurden 50 µl CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen mit 2,5-5 µl DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 50 s bei 42 °C (Hitzeschock) behandelt und dann sofort 2 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurden 950 µl SOC-Medium (2.1.4) zu den Zellen zugegeben und 1 h bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 4 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, in einem Tropfen Überstand resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

3.2.14.3 Insertionskontrolle

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Vektoren enthielten alle wenigstens ein Antibiotikumresistenz-Gen. Durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (oder mehrerer Antibiotika) zum Anzuchtmedium wurde die erste Selektion auf transformierte und nicht transformierte *E. coli* durchgeführt (3.2.1).

Bei Transformationen mit Vektoren, die das lacZ'-Gen zur α-Komplementation der β-Galaktosidase enthielten, wurde eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide durchgeführt. Die Agarplatten mit Antibiotikum wurden mit 30 µl 0,5 M IPTG Lösung und 30 µl X-Gal Lösung (2.1.4) überschichtet. Der Zellenüberstand wurde anschließend wie in 3.2.1 beschrieben ausplattiert. Bakterienkolonien, in denen durch Insertion die Expression der β-Galaktosidase nicht möglich ist, können nicht das Substrat X-Gal enzymatisch umsetzen und bilden weiße Kolonien.

3.2.15 Plasmidisolation aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmiden aus den verwendeten *E. coli*-Stämmen wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Dolly, 1979) genutzt. Für die Isolierung reiner Plasmid-DNA wurden Kits nach Angaben der Hersteller verwendet.

Die Bakterien werden durch SDS in alkalischer Lösung lysiert, der Zellinhalt wird dadurch freigesetzt, RNA wird durch RNase abgebaut. Im nächsten Schritt werden in der Lösung vorhandene Proteine und chromosomale DNA mit Natriumacetat gefällt. Die Plasmid-DNA wird anschließend mit Isopropanol präzipitiert.

3.2.15.1 Plasmid-Minipräparation

Vier ml einer Übernachtskultur wurden bei 4500 rpm 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Danach werden 300 µl Puffer P2 zugegeben und der Ansatz zur vollständigen Lyse für max. 5 min auf Eis inkubiert. Weiter wurden 300 µl Puffer P3 zupipettiert und vermischt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurde 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die in der wässrigen Phase enthaltene Plasmid-DNA wurde mit dem 0,7-fachen Volumen Chloroform versetzt und zentrifugiert. Anschließend konnte aus der wässrigen Phase die Plasmid-DNA mit Ethanol (3.2.7) gefällt werden.

3.2.15.2 Plasmid-Minipräparation mit einem Kit

Die pelletierte Übernachtskultur wurde laut Herstellerangaben (Mini-Plasmid-Extraktionskit) aufgearbeitet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 50 µl TE-Puffer eluiert.

3.2.16 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde das automatische Sequenzier-System von Applied Biosystems (Modell 377) verwendet. Hiermit ist es möglich, durch Fluoreszenzfarbstoffe markierte DNA-Fragmente während eines Polyacrylamidgellaufs automatisch zu erfassen. Dafür ist die Verwendung einer on-line-Detektion und der Einsatz eines Lasers erforderlich. Dieser wird zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe benötigt. Die Markierung der DNA erfolgt dabei am 3'-Ende durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden als Terminatoren.

3.2.16.1 Probenaufbereitung

Der BigDye Cycle Sequenzierungs-Kit von Applied Biosystems (Weiterstadt) enthält sämtliche Lösungen für den Premix und die *Taq*-Polymerase. Als Template diente saubere Plasmid-DNA. Die DNA-Konzentration wurde UV-spektroskopisch (3.2.6) bei 260 nm bestimmt. Der verwendete Primer war entweder vektor- oder insertspezifisch.

Sequenzierungsansatz:

BigDye Lösung	2 µl
DNA Template	700 ng
Primer	2 pmol
Bidest. Wasser	ad 10 µl

Thermocycler-Programm:

1. Denaturierung:	15 s bei 94 °C	
2. Annealing:	25 s bei 48 °C	30 Zyklen
3. Elongation:	1 min 30 s bei 72 °C	

Danach wurden überschüssige Primer, nicht eingebaute Nukleotide und Dye-Terminatoren entfernt (3.2.7). Vor dem Auftragen auf das Gel wurde das trockene Pellet in 2 µl Ladepuffer (2.1.4) aufgenommen, 90 s bei 98 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.

3.2.16.2 Sequenziergel

Die Zusammensetzung des Gels ist in 2.1.4 zu finden. 9 g Harnstoff wurden in 30 % Acrylamidlösung, 10x TBE Puffer und HPLC-Wasser gelöst. Danach wurden 10 µl TEMED und 230 µl 10 % APS-Lösung zupipettiert und die Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Schichtdicke des Gels betrug 0,2 mm. Durch Zugabe von APS und TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Nach 1 Stunde wurde das Gel mit Produkten der Sequenzierreaktion (3.2.16.1) beladen.

3.2.16.3 Auswertung der Sequenzierdaten

Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels des Softwareprogramms Lasergene 99 DNA STAR bearbeitet. Für initiale Ähnlichkeitssuchen wurden die Großdatenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und des European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg, Deutschland) genutzt.

3.2.17 Expression von GST-Fusionsproteinen

Zur Herstellung größerer Mengen an rekombinantem Protein wurde das jeweilige Genkonstrukt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Vektor p-GEX-G (2.1.5)

kloniert. In diesem Vektor wurde das gewünschte Protein in Fusion mit der Glutathion-S-Transferase von *E. coli* exprimiert. Der Vorteil besteht in einer einfachen affinitätschromatographischen Reinigungsmethode. Glutathion-S-Transferase bindet stark sein Substrat Glutathion. Das Fusionsprotein lässt sich somit spezifisch an eine Glutathion-Sepharose-Matrix binden und anschließend mit freiem Glutathion eluieren.

3.2.17.1 Expression

Das Konstrukt wurde in *E. coli* BL21 transformiert (2.1.5) und auf LB-Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol zur Selektion ausplattiert. Ein Klon wurde über Nacht in 10 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium aufgezogen. Davon wurden 3 ml zum Animpfen in eine 100 ml Hauptkultur (LB-Medium) gegeben und bei 37 °C bis zur OD₆₀₀ von etwa 0,8 inkubiert. Die Induktion der Fusionsprotein-Expression erfolgte durch Zugabe von 150 µl steriler IPTG-Lösung und 100 µl Ampicillin-Lösung (2.1.4). Dann folgten weitere 4-16 h Inkubation bei 25 °C. Danach wurde die Kultur 5 min bei 4500 rpm abzentrifugiert.

3.2.17.2 Zellaufschluss

Das Pellet wurde komplett in 1,6 ml Aufschlusspuffer (2.1.4) resuspendiert. Die Bakterien wurden mit Hilfe von Ultraschall oder durch Zugabe von 2 mg Lysozym (30 min auf Eis) aufgeschlossen. Das Lysat wurde 10 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Affinitätschromatographie (3.1.8.2) aufgereinigt.

3.2.17.3 Spaltung des GST-Fusionsproteins

Die Fraktion, die das rekombinante Enzym enthielt, wurde mit 3 µl Faktor Xa (3 Units) versetzt und 2 h bei 16 °C inkubiert. Die erfolgreiche Abspaltung des GST-Fusionsteils wurde anschließend mittels SDS-PAGE überprüft.

4. Ergebnisse

4.1 Pflanzenmaterial

4.1.1 Zellkulturen von *Hypericum calycinum*

In der Arbeitsgruppe bereits verfügbare Kalluskulturen von *H. calycinum* (Abb. 4-1) wurden zum Anlegen von Zellsuspensionskulturen benutzt.



Abb. 4-1: Kalluskultur von *H. calycinum* auf LS-Medium

Die Zellkulturen wuchsen in zwei verschiedenen flüssigen Nährmedien im Dunkeln. Die Zellen in LS-Medium (Abb. 4-2) waren gelb gefärbt und vermehrten sich schnell. Sie dienten zum Anlegen einer Zellsuspension in BDS-Medium (Abb. 4-3). Diese Kulturen wiesen anfangs eine ähnliche Farbe auf wie die in LS-Medium, verfärbten sich aber innerhalb von vier bis sechs Wochen braun. Auch sie wuchsen schnell und wurden wöchentlich in frisches BDS-Medium übertragen. Ihre Charakterisierung ist in 4.5 beschrieben.



Abb. 4-2: Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* in LS-Medium



Abb. 4-3: Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* in BDS-Medium

4.1.2 Intakte Pflanzen

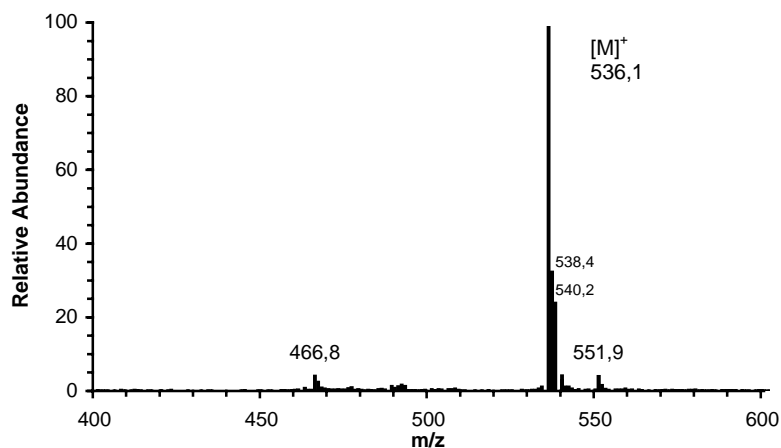
Differenzierte Pflanzen von *Hypericum perforatum* stammten aus dem Arzneipflanzengarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig und der Institutsumgebung. Für die Isolation von poly(A⁺)-RNA wurden Knospen, Blüten, Fruchtknoten und Früchte genutzt. Das Material wurde entweder sofort aufgearbeitet oder in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und für spätere Untersuchungen bei -80 °C gelagert.

4.2 Nachweis von Hyperforinen in *H. calycinum*-Zellkulturen

Wie bereits früher durch Co-Chromatographie mit authentischen Referenzsubstanzen und UV-Spektroskopie gezeigt (Zapletalová, 1999), enthalten *H. calycinum*-Zellkulturen Hyperforine. Hauptverbindung ist das Adhyperforin, während Hyperforin nur in geringer Menge vorkommt. Um die Identität der Inhaltsstoffe abzusichern, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. A. Mellenthin vom Institut für Lebensmittelwissenschaft und Lebensmittelchemie der Universität Bonn HPLC-MS-Analysen (3.1.7) durchgeführt. Für die dem Hyperforin und dem Adhyperforin entsprechenden Komponenten in Chloroform-Extrakten wurden Massenspektren aufgenommen (Abb. 4-4 und 4-5). Diese stimmten mit denen der beiden Referenzsubstanzen überein. Für Hyperforin erscheint der Molekülpeak m/z

536 und für Adhyperforin der Molekülpeak m/z 550. Die Differenz zwischen den Molekülmassen entspricht einer Methylengruppe. Diese Ergebnisse bestätigten, dass es sich bei den Inhaltsstoffen um Hyperforin und sein Homolog Adhyperforin handelte.

a)



b)

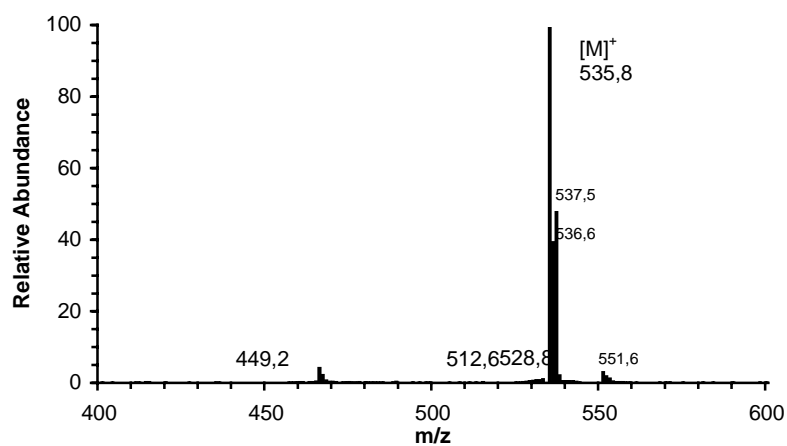
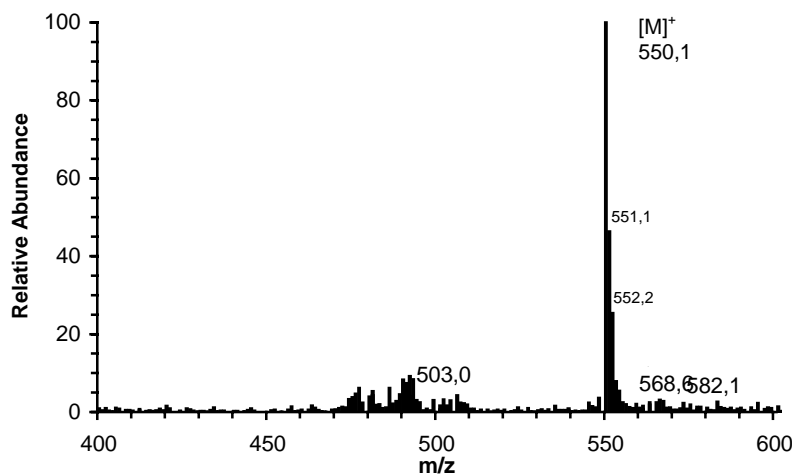


Abb. 4-4: EI-Massenspektren des Hyperforins aus *H. calycinum*-Zellkulturen (a) und der authentischen Referenzsubstanz (b)

a)



b)

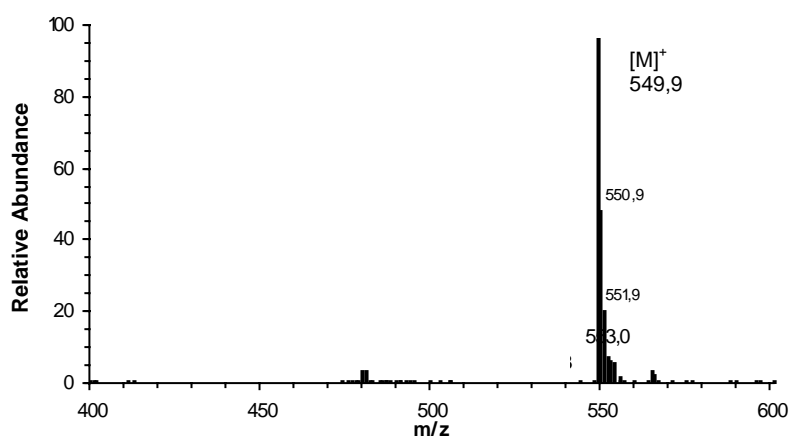


Abb. 4-5: EI-Massenspektren des Adhyperforins aus *H. calycinum*-Zellkulturen (a) und der authentischen Referenzsubstanz (b)

4.3 Stabilität der Hyperforine

Die authentischen Referenzsubstanzen Hyperforin und Adhyperforin wurden bei -20 °C unter Stickstoffatmosphäre und Lichtausschluss gelagert. Sie blieben über Monate stabil. Zellkultur-Extrakte wurden ebenfalls bei -20 °C und Lichtausschluss gelagert, entweder trocken oder als methanolische Lösungen. Auch hier konnte nur ein minimaler Abbau der Inhaltsstoffe beobachtet werden.

4.4 Versuche zur Optimierung der Nährmedien

Die Zusammensetzung der Nährmedien wurde verbessert, indem die Vitamin- und Hormon-Konzentrationen variiert wurden (Tab. 4-1). Für die Charakterisierung der Hyperforin-Produktion in *H. calycinum*-Zellkulturen wurde das BDS-Nährmedium eingesetzt. Parallel wurden diese Untersuchungen mit den auf LS-Medium gehaltenen Zellkulturen durchgeführt. Zu dem Standard-Medium wurden folgende Hormone und/oder Vitamine zugegeben:

Tab. 4-1: Variation der Zusammensetzung des BDS-Mediums

	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4
Nicotinsäure	2 mg/l	1 mg/l	0,5 mg/l	0,1 mg/l
Pyridoxol	2 mg/l	1 mg/l	0,5 mg/l	0,1 mg/l
Kinetin	0,2 mg/l	0,1 mg/l	0,05 mg/l	0,01 mg/l
Dicamba	150 µg/l	75 µg/l	37,5 µg/l	7,5 µg/l

Es wurden Chloroform-Extrakte gewonnen, mittels HPLC analysiert und die gebildeten Hyperforine quantifiziert. Nicht immer korrelierte das Wachstum der Zellen mit der Produktion der Sekundärmetabolite. Kulturen in BDS-Medium 1 und 2 waren in der Produktion anderen Zellkulturen überlegen, lieferten allerdings nur kleine Mengen an Zellmaterial und starben nach wenigen Wochen ab. Solche Suspensionen waren für die dauerhafte Untersuchung ungeeignet. Erhöhte Hormonkonzentration beeinflusste die Produktausbeute in BDS-Medium. In LS-Medium beeinflusste die erhöhte Vitaminkonzentration deutlicher die Produktion. Zellen in BDS-Medium vermehrten sich zwar langsamer als die in LS-Medium, die Produktion der Hyperforine war jedoch höher. Wegen der niedrigeren Absterberate der Zellen in BDS-Medium ohne Hormon- und/oder Vitaminzusatz wurden diese für die weiteren Untersuchungen gewählt.

4.5 Charakterisierung der *H. calycinum*-Zellkulturen in BDS-Medium

Die Veränderung des Frisch- und Trockengewichts nach Animpfung mit einer bestimmten Menge Zellmaterial (3.1.1.1) wurde bereits früher ermittelt (Zapletalová, 1999). Ein typischer Wachstumsverlauf wurde beobachtet (Abb. 4-6). Nach einer Verzögerungsphase von 2 Tagen

vermehrten sich die Zellkulturen linear zwischen Tag 2 und 4 und traten dann in die Abknick- und Stationärphase ein, wobei sich die Ausgangsmasse verdreifachte.

4.5.1 Adhyperforingehalt

Parallel zum Zellwachstum wurde der Adhyperforin-Gehalt der Suspensionskulturen mittels HPLC gemessen (3.1.1.2). Er stieg von Tag 2 bis 6 linear an und erreichte das Maximum am 8. Tag mit 0,03 % des Trockengewichts (Abb. 4-6). Der Hyperforin-Gehalt war etwa ein Zehntel der Adhyperforin-Konzentration. Um die Effizienz der Extraktion für die Quantifizierung zu prüfen, wurde den Zellkulturen in einigen Experimenten die Referenz Hyperforin zugesetzt (3.1.1.2). Die prozentuale Rückgewinnungsrate lag bei 89 %.

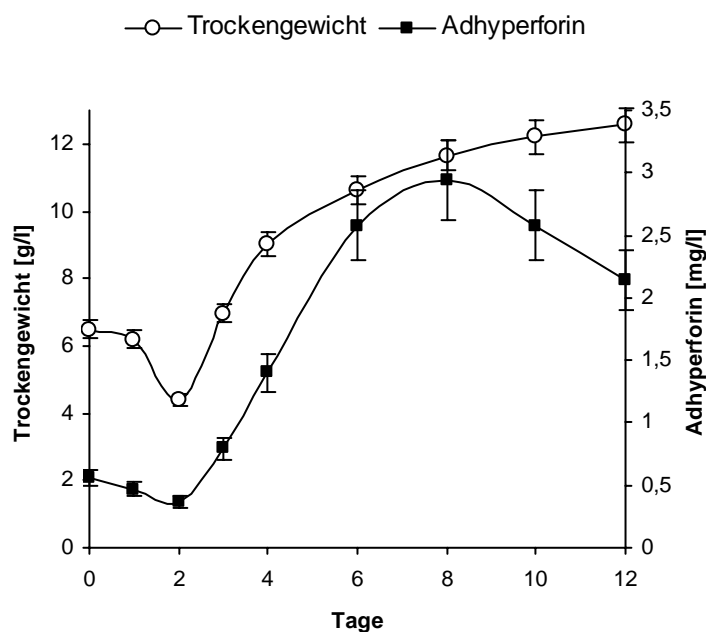


Abb. 4-6: Wachstum und Adhyperforin-Bildung von *H. calycinum*-Zellkulturen

4.5.2 Fütterungsexperimente

Drei Tage alten *H. calycinum*-Suspensionskulturen wurde unter Lichtausschluss eine potenzielle Vorstufe von Hyperforinen zugegeben (3.1.1.3), nämlich Trihydroxyacetophenon. Nach 3 Tagen Kultivierung wurden die gewonnenen Extrakte mittels HPLC analysiert. Ein Einfluss auf die Hyperforinbildung in den Zellkulturen wurde nicht beobachtet.

4.5.3 Elicitierung

In vielen Zellkulturen kann die Produktion von Sekundärmetaboliten durch Zugabe von Elicitoren stimuliert werden. Zum Beispiel sind Jasmonate wichtige pflanzliche Stresshormone, die verschiedene Abwehrreaktionen induzieren. Daher wurde der Einfluss von Methyljasmonat und Isoleucyl-Jasmonat auf *H. calycinum*-Zellkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums untersucht. Es konnte jedoch keine signifikante Steigerung der Hyperforin- und Adhyperforin-Produktion erzielt werden.

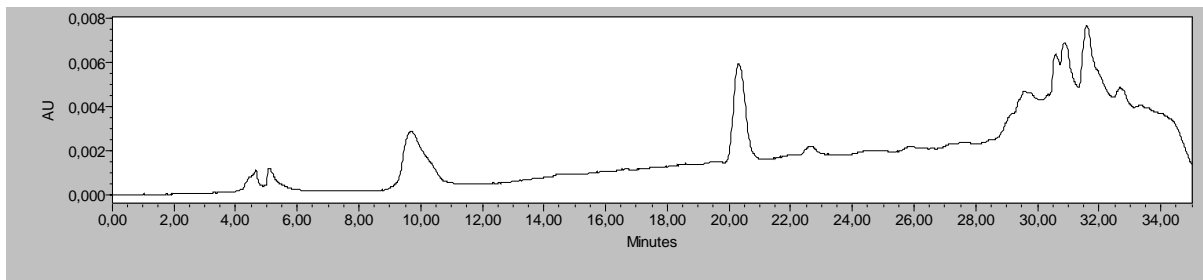
4.6 Detektion von Enzymaktivitäten

Dass im Johanniskraut Hyperforine, Xanthone und Flavonoide vorkommen, wies darauf hin, dass es drei Polyketid-Synthasen geben könnte. Ob diese Enzymaktivitäten auch in *H. calycinum*-Zellkulturen vorkommen, wurde geprüft. Zellfreie Extrakte (3.1.10.1; 3.1.10.2) wurden mit Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA in Gegenwart von Malonyl-CoA inkubiert (3.1.10.5). Durch nachfolgende HPLC-Analyse konnte die Bildung eines Produkts, das bei Co-Chromatographie der authentischen Referenz entsprach, für jede Enzymaktivität detektiert werden (Abb. 4-7; 4-8; 4-9). Somit gab es erste Hinweise auf Isobutyrophenon-Synthase, Benzophenon-Synthase und Chalcon-Synthase.

In Kontrollinkubationen mit denaturiertem Protein wurden die Produkte nicht nachgewiesen, so dass es sich um enzymatische Produkte handelte.

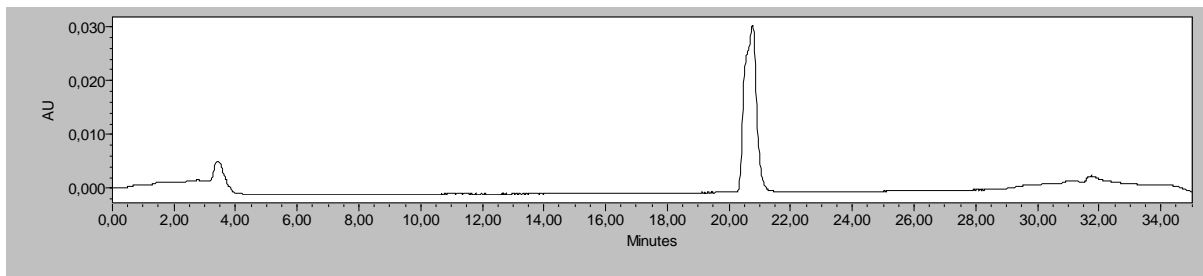
a)

Produkt PIBP



b)

Referenz PIBP



c)

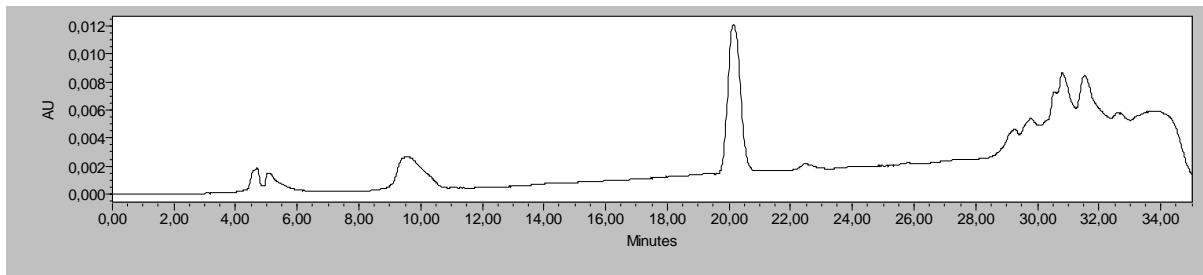


Abb. 4-7:

- a) HPLC-Analyse eines Enzymansatzes mit Isobutyryl-CoA
- b) Referenzsubstanz Phlorisobutyrophenon
- c) Co-Chromatographie

Produkt Phlorbenzophenon

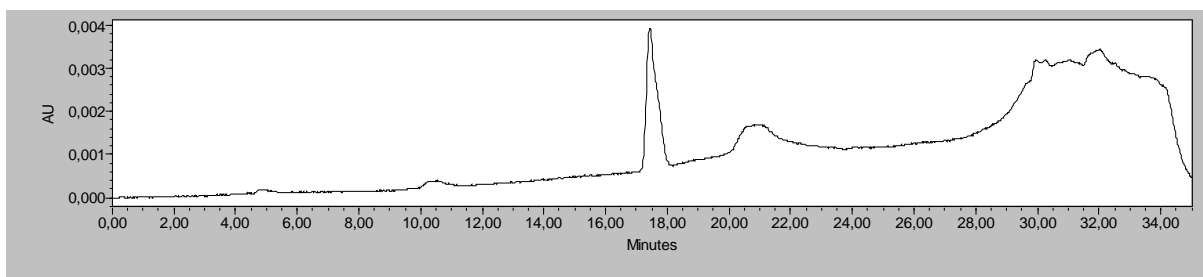


Abb. 4-8: HPLC-Analyse eines Enzymansatzes mit Benzoyl-CoA

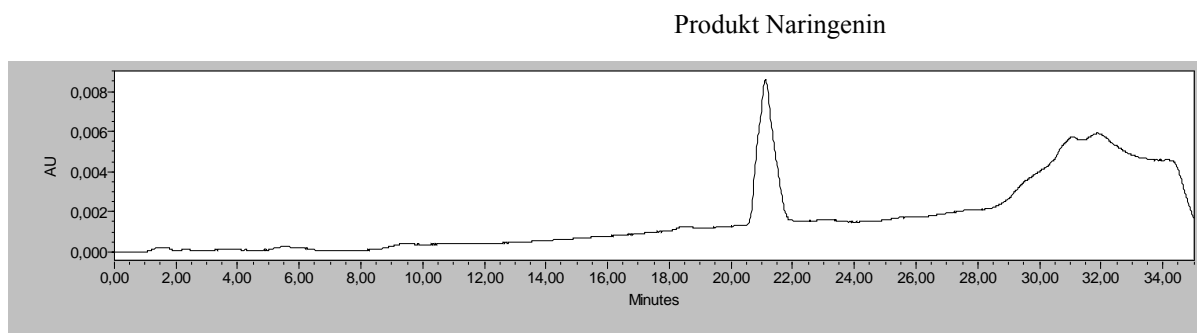


Abb. 4-9: HPLC-Analyse eines Enzymsatzes mit p-Cumaroyl-CoA

4.6.1 Analyse des enzymatisch gebildeten Phlorisobutyrophenons

Die Bildung des Hyperforin-Grundgerüsts wurde außer durch Co-Chromatographie auch mittels GC-MS (3.1.6) analysiert. Die Produktausbeute der enzymatischen Reaktion war relativ gering, deshalb wurde ein 4 ml-Ansatz inkubiert und aufgearbeitet. Da ein direkter gaschromatographischer Nachweis nicht möglich war, wurden die freien Hydroxylgruppen des Produkts mit Essigsäureanhydrid zu den leichter flüchtigen Acetylaten derivatisiert. Die acetylierte synthetische Referenz (4.6.2) wurde bei 14,9 min eluiert, ebenso das acetylierte enzymatische Produkt. Das Massenspektrum des enzymatisch gebildeten Phlorisobutyrophenons stimmte mit dem Spektrum der Referenzsubstanz überein (Abb. 4-10).

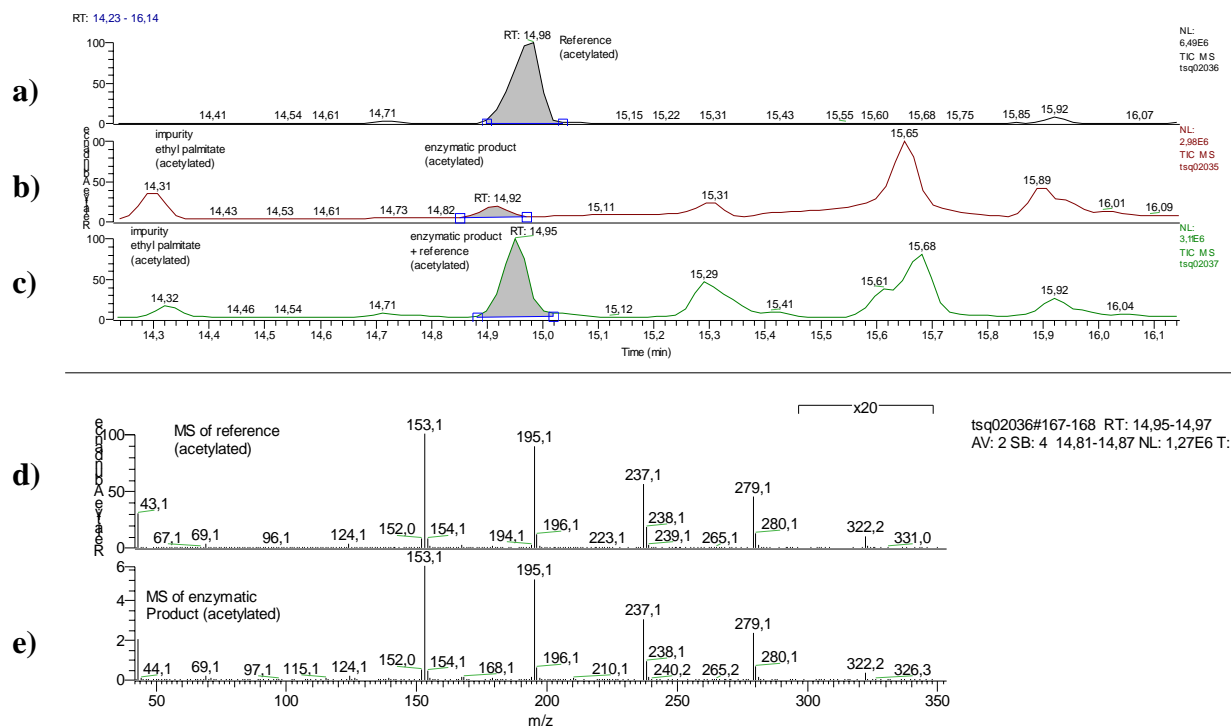


Abb. 4-10: GC-MS-Analyse des enzymatisch gebildeten Phlorisobutyrophenons und der synthetisierten Referenzsubstanz (nach Acetylierung). GC der Referenzsubstanz (a) und des enzymatischen Produkts (b) sowie Co-Chromatographie (c). Massenspektren der Referenzsubstanz (d) und des enzymatischen Produkts (e).

4.6.2 Synthese der Referenzsubstanz Phlorisobutyrophenon

Phlorisobutyrophenon wurde nach 3.1.2 synthetisiert. Das Reaktionsprodukt war gelblich und zeigte auf einer mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichteten Aluminiumfolie bei einer Wellenlänge von 366 nm eine dunkelblaue Fluoreszenz. Neben der einfach acylierten Verbindung waren zweifach und dreifach acylierte Substanzen zu detektieren. Aus diesem Grund wurde eine säulenchromatographische Aufreinigung durchgeführt (3.1.2.1). Das gereinigte 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanon zeigte ein Absorptionsmaximum bei 286 nm, was im Einklang mit publizierten Daten stand (Klink et al., 1999).

Die weitere Identifizierung erfolgte mittels GC-MS. Nach der Summenformel C₁₀H₁₂O₄ war eine Molmasse von 196,07 g/mol für das Produkt zu erwarten. Dieser Molekülpeak trat auch im Massenspektrum auf (Abb. 4-11). Auch das NMR-Spektrum entsprach den publizierten Daten (Amer et. al., 1983).

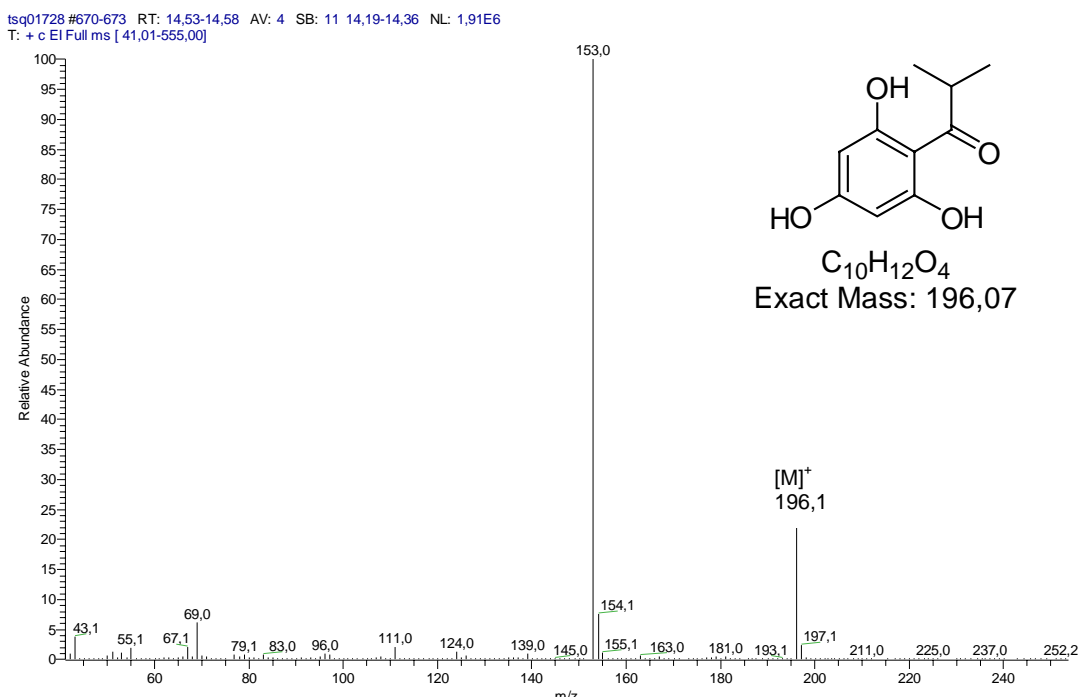


Abb. 4-11: EI-Massenspektrum des synthetisierten Phlorisobutyrophenons

4.6.3 Veränderung der spezifischen Enzymaktivitäten während des Zellkulturwachstums

Um zu untersuchen, ob es sich bei den detektierten Enzymaktivitäten um drei eigenständige Enzyme handelt oder ein Enzym mehrere Substrate umsetzt, wurde an jedem Tag des Zellkulturwachstums ein Enzymextrakt gewonnen (3.1.10.1; 3.1.10.2) und mit den drei Substraten Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA inkubiert. Die Inkubationsprodukte wurden mittels HPLC und Standardlösungen der Referenzsubstanzen Phlorisobutyrophenon, Phlorbenzophenon und Naringenin quantitativ analysiert (3.1.10.5 und 3.1.5). Die spezifischen Aktivitäten wurden berechnet und die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte in Abb. 4-12 zusammengefasst.

Die Isobutyrophenon-Synthase-Aktivität stieg nach der Überimpfung der Zellen schnell an und erreichte ihr Maximum bereits am 2. Tag. Es folgte ein Plateau bis zum 4. Tag, wonach die Aktivität wieder abnahm. Die Benzophenon-Synthase- und die Chalkon-Synthase-Aktivitäten stiegen langsamer an und erreichten ihre Maxima am 3. bzw. 4.-5. Tag.

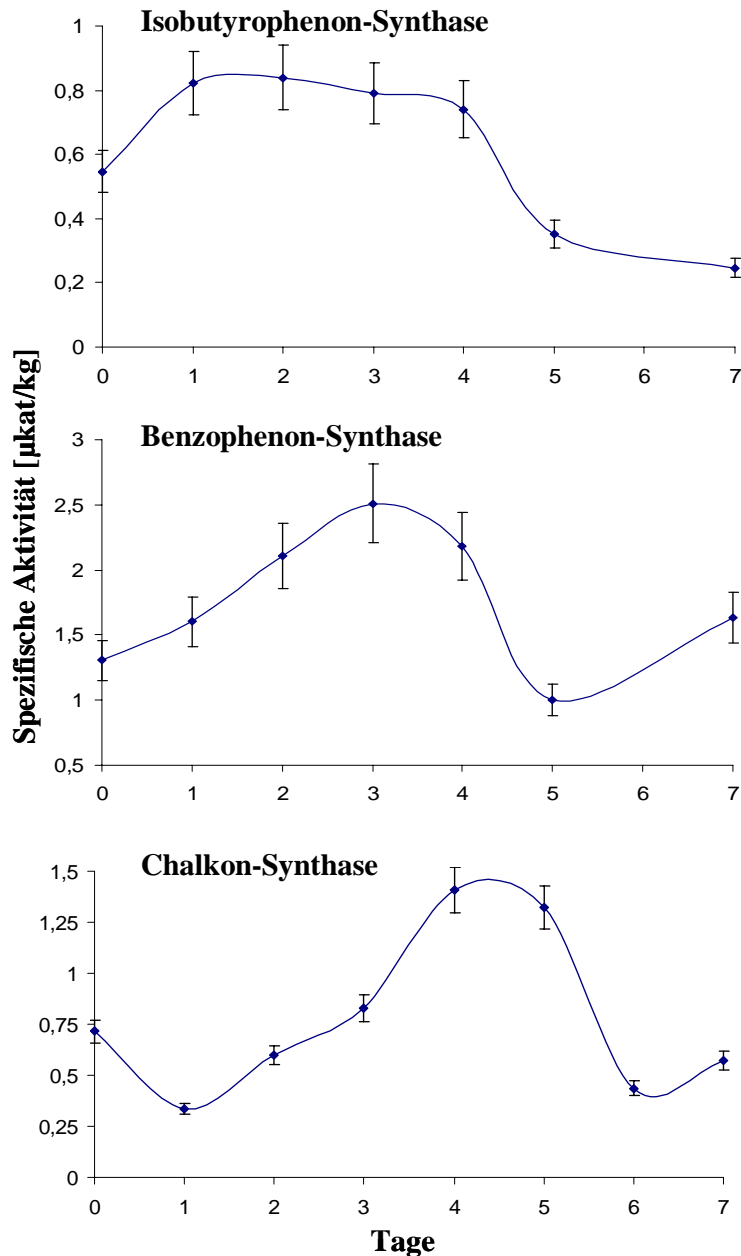


Abb. 4-12: Veränderung der spezifischen Aktivitäten der Isobutyrophenon-Synthase, Benzophenon-Synthase und Chalkon-Synthase während des Zellkulturwachstums

4.6.4 Anionenaustauschchromatographie der Polyketid-Synthasen

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten im Laufe des Zellkulturwachstums erwies, dass jedes der drei vermuteten Enzyme eine andere Kinetik zeigte. Dies war ein guter Hinweis, aber noch kein Beweis für das Vorkommen dreier verschiedener PKS in den Zellkulturen von *H. calycinum*. Daher wurde eine Trennung der Enzyme aus dem Rohextrakt mittels Anionenaustauschchromatographie vorgenommen (3.1.8). Jede zweite Fraktion wurde mit den drei verschiedenen Starter-Substraten inkubiert (3.1.10.5) und die Produkte mittels HPLC

quantitativ analysiert. Die drei PKS wurden erfolgreich getrennt (Abb. 4-13). Die Benzophenon-Synthase wurde als erste von der Säule eluiert, ihre höchste Aktivität wurde in Fraktion 7 nachgewiesen. Danach wurde die Isobutyrophenon-Synthase eluiert, deren maximale Aktivität in Fraktion 11 detektiert wurde. Als letzte wurde die Chalkon-Synthase von der Säule gelöst, wobei ihre Aktivität in der Fraktion 15 am höchsten war. Während die BPS und die CHS die jeweils anderen Substrate nur geringfügig umsetzten, hatte die BUS auch eine relativ hohe Aktivität mit Benzoyl-CoA.

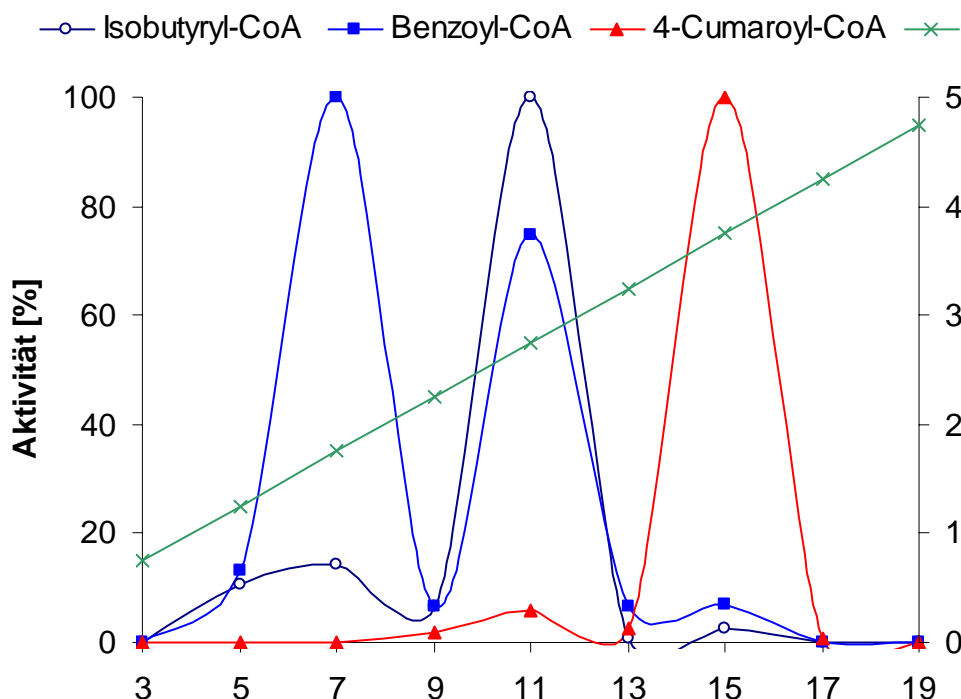


Abb. 4-13: Trennung von BPS, BUS und CHS mittels Anionenaustauscher

4.6.5 Stabilität von Enzymextrakten und Produkten

Entsalzte Extrakte (3.1.10.2) wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach dem ersten langsamen Auftauen auf Eis war die enzymatische Aktivität um etwa 40 % reduziert und nach dem zweiten Einfrieren und Auftauen in der Regel keine Aktivität mehr detektierbar.

Die enzymatischen Produkte wurden nach dem Einengen zur Trockne ebenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Sie waren über lange Zeit (Wochen bis Monate) stabil. Unmittelbar vor der HPLC-Analyse wurden sie in 50 oder 100 μl Methanol aufgenommen.

Sowohl die aktiven Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie als auch die Fraktionen mit gereinigten rekombinanten Enzymen (4.8.1) wurden im jeweiligen Puffer bei -20 °C gelagert. Auch hier verloren die Proteine nach dem wiederholten Auftauen und Einfrieren ihre Aktivität.

4.7 Klonierung von PKS aus *H. calycinum*-Zellkulturen und *H. perforatum*-Pflanzen

In allen bis jetzt klonierten Typ III-PKS sind drei an der Katalyse beteiligte Aminosäuren hoch konserviert: Cys 164, His 303 und Asn 336. Cystein fungiert im aktiven Zentrum als Nukleophil, Histidin und Asparagin bewerkstelligen die Decarboxylierung von Malonyl-CoA. Beim Vergleich von Polyketidsynthasen aus der Datenbank ergab sich eine Homologie auf Aminosäureebene von 48 bis 73 %.

4.7.1 Isolierung von poly(A⁺)-RNA

Die biochemischen Untersuchungen an Zellkulturen von *H. calycinum* zeigten, dass die Isobutyrophenon-Syntase-Aktivität vom 1.-4. Tag nach dem Transfer von Zellen in frisches Medium hoch war. Die CHS erreichte ihre maximale Aktivität am 4. Tag und die BPS am 3. Tag. Da das Konzentrationsmaximum der spezifischen mRNA in der Regel der maximalen Enzymaktivität vorausgeht, wurde poly(A⁺)-RNA aus den *H. calycinum*-Zellkulturen am Tag 1 und 2 isoliert.

Nach den Untersuchungen von Tekelova et al. (2000) liegen in intakten *H. perforatum*-Pflanzen hohe Hyperforin-Konzentrationen in den Knospen, Blüten und Früchten vor (Abb. 4-14). Der Hyperforin-Gehalt liegt in 3 mm großen Knospen bei 2,5 % des Trockengewichts und steigt bis zu 7 % in den 9-13 mm großen Knospen. Flavonoide akkumulieren hauptsächlich in älteren Knospen und Blüten.

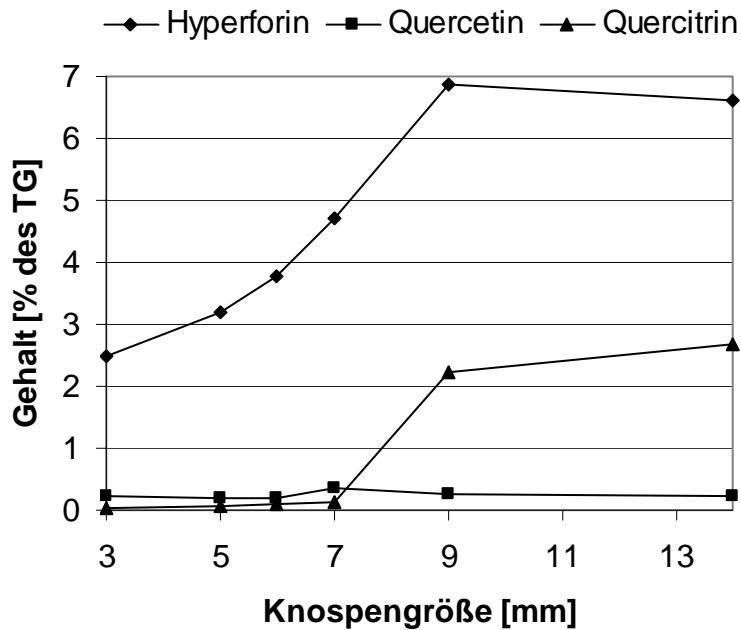


Abb. 4-14: Gehalt an Hyperforinen und Flavonoiden in sich entwickelnden Knospen von *H. perforatum*. Daten aus Tekelova et al. (2000)

Nach diesen Angaben wurden 5 mm große Knospen geerntet, um entweder als Frischmaterial oder nach Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ der Isolierung von poly(A⁺)-RNA zu dienen. Diese wurde mit dem Isolationskit der Firma Amersham Biosciences laut Herstellerangaben gewonnen (3.2.5). Ausgehend von den mRNA-Präparationen wurde cDNA synthetisiert (3.2.8) und weiter für PCR eingesetzt.

4.7.2 Synthese von degenerierten Oligonukleotiden

Für die Amplifikation der gesuchten PKS-cDNAs wurden zwei strangabwärts (dp1, dp2) und zwei strangaufwärts (dp3, dp4) gerichtete Primer entworfen. Sie leiteten sich von konservierten Regionen der bekannten PKS-Sequenzen ab. Standen für eine Basenposition im Primer alle vier Nukleotide zur Auswahl, wurde Inosin verwendet. Inosin besitzt die Eigenschaft, mit allen vier Nukleotiden stabile Wasserstoffbrücken zu bilden (Kwok et al., 1997). Ein mit Inosin modifizierter Primer steigert die sonst durch den Einbau von A,T,G oder C verringerte Wahrscheinlichkeit der Hybridisierung mit dem Zielmolekül.

Theoretisch sollten durch Verwenden dieser Primer in der PCR bei niedrigen Anlagerungs-Temperaturen ($40\text{--}55\text{ }^{\circ}\text{C}$) unterschiedliche PKS-Fragmente mit höheren oder niedrigeren Homologien zu bekannten PKS amplifiziert werden. Es sollten Fragmente sowohl der CHS als auch der BUS und BPS auftreten. Nach dem Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der

Datenbank bestätigte sich diese Erwartung aber nicht. Allgemein werden bevorzugt jene mRNAs amplifiziert, die in der isolierten poly(A⁺)-RNA im Überschuss vorliegen. Gering transkribierte Gene werden dagegen nicht detektiert.

Wie in der Einleitung beschrieben, katalysiert die Isovalerophenon-Synthase die Bildung der Phloroglucinderivate in *Humulus lupulus*. Als Starter-Substrate dienen hier Isovaleryl-CoA und Isobutyryl-CoA. Die funktionelle Ähnlichkeit der BUS aus Johanniskraut wurde genutzt, um Oligonukleotide für die spezifische Amplifikation von Fragmenten dieses Enzyms zu konstruieren. Der Datenbankvergleich der Aminosäure-Sequenzen von zwei Valerophenon-Synthasen, aus Hopfen und aus *Psilotum nudum*, und von einigen CHS-Sequenzen zeigte DNA-Abschnitte, in denen die Homologie unter den VPS-Sequenzen höher war als die Homologie zu den CHS-Sequenzen. Von diesen Bereichen wurden fünf strangabwärts (APSdp-1; -3; -5; -6; -7 sense) und zwei strangaufwärts (APS dp2 anti, APS dp4 anti) gerichtete, degenerierte Primer abgeleitet.

Außerdem wurden ausgehend von der Nukleotid-Sequenz der VPS aus *Humulus lupulus* zweigenspezifische Primer konstruiert (VPSHum sense, VPSHum anti).

4.7.3 Amplifikation von PKS-Fragmenten mit degenerierten Primern

Der Amplifikation diene als *sense*-Primer einer der degenerierten Primer in Kombination mit einem zweiten degenerierten *reverse*-Primer oder mit dem RACE_{long}- bzw. RACE_{short}-Primer (Tabelle 4-2). Die erwartete Größe der Produkte lag zwischen 450 und 1100 bp. Als Matrize dienten cDNAs, die in der RT-Reaktion synthetisiert wurden (3.2.8).

Tab. 4-2: Kombinationen von degenerierten Primern

+: PCR-Produkt, -: kein PCR-Produkt oder keine PCR mit diesen Primern durchgeführt

xxx: Kombination nicht möglich

Primer1/ Primer 2	dp1	dp2	dp3	dp4	APS dp1	APS dp2	APS dp3	APS dp4	APS dp5	APS dp6	APS dp7	RACE long/ short
dp1	xxx	xxx	+	+	xxx	+	xxx	-	xxx	xxx	xxx	+
dp2		xxx	+	+	xxx	-	xxx	-	xxx	xxx	xxx	+
dp3			xxx	xxx	+	xxx	-	xxx	-	-	-	+
dp4				xxx	-	xxx	-	xxx	-	-	-	-
APS dp1					xxx	+	xxx	-	xxx	xxx	xxx	+
APS dp2						xxx	-	xxx	-	-	-	+
APS dp3							xxx	-	xxx	xxx	xxx	+
APS dp4								xxx	-	-	-	+
APS dp5									xxx	xxx	xxx	+
APS dp6										xxx	xxx	+
APS dp7											xxx	+
RACE long/ short												xxx

Obwohl die durchschnittliche Schmelztemperatur der Primer zwischen 55 und 66 °C lag, erfolgte die PCR bei einer Anlagerungs-Temperatur von 45 °C, die Zeit der Extension betrug 1,5 min. Alternativ wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt, wobei die Anlagerungs-Temperatur von 55 °C schrittweise (in jedem Zyklus um 1 °C) auf 45 °C reduziert wurde. Die *Taq*-Polymerase wurde nach der anfänglichen zweiminütigen Denaturierung direkt vor dem ersten Zyklus zugegeben (Hot Start-PCR), um eine noch größere Selektivität der PCR zu erreichen. Um sicherzustellen, dass tatsächlich der gewünschte Bereich der PKS amplifiziert wurde und auch weil die Ausbeute der ersten PCR gering war, wurde mit dem weiter innen liegenden Primer RACE_{nested} und dem PCR-Produkt eine geschachtelte (nested) PCR durchgeführt.

Standard-PCR:

95 °C 2 min

94 °C 25 s

45 °C 25 s 30 Zyklen

72 °C 1 min 30 s

72 °C 15 min

Touchdown-PCR:

95 °C 2 min

94 °C 25 s

55-45 °C jew. 25 s insg. 10 Zyklen, pro Zyklus erfolgte eine Absenkung der Anlagerungs-Temperatur um 1 °C

72 °C 1 min 30 s

94 °C 25 s

45 °C 25 s

20 Zyklen

72 °C 1 min 30 s

72 °C 15 min

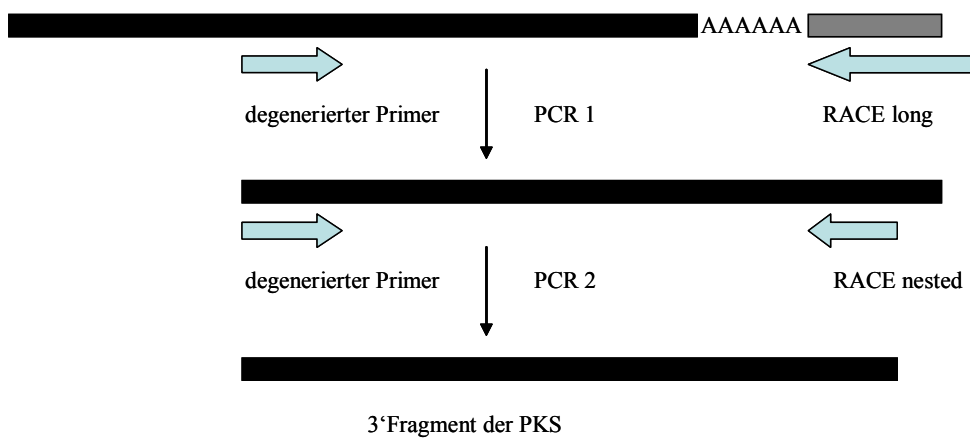


Abb. 4-15: Schema der PCR mit degenerierten und RACE Primern

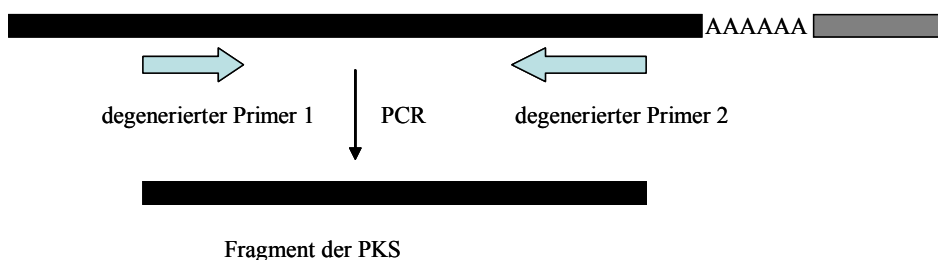


Abb. 4-16: Schema der PCR mit zwei degenerierten Primern

4.7.4 Amplifikation von CHS-Fragmenten

Die PCR mit degenerierten Primern lieferte mehrere Amplifikate, die kloniert und sequenziert wurden. Bei dem anschließenden Datenbankvergleich ergaben sich Ähnlichkeiten mit CHS aus *H. androsaemum* und anderen Spezies. Die Homologie war relativ hoch, sie lag bei 85 bis 98 % je nach Länge des sequenzierten Fragments. Es wurden Sequenzen von gesuchten CHS

aus *H. perforatum* und *H. calycinum* gefunden. Ein Fragment enthielt den 3'-terminalen poly(A⁺)-Bereich und auch das davor liegende Translationsstoppcodon.

4.7.5 Amplifikation von BUS-Fragmenten mit degenerierten Primern

Für die BUS und BPS waren Homologien von 50-80 % zur CHS zu erwarten. Verwendet wurden ein degenerierter Primer (dp1) und ein 1:4 Gemisch aus den beiden universellen RACE_{long} und RACE_{short} Anker-Primern, gefolgt von einem genspezifischen Primer. Das führte zur Amplifikation von zwei Fragmenten, die für die gesuchte BUS kodieren könnten. Auch sie enthielten den 3'-terminalen poly(A⁺)-Bereich. Die vollständigen Sequenzen der mutmaßlichen BUS-cDNAs konnten im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr erhalten werden. Die Reaktionsbedingungen wurden mehrfach verändert, es wurden DMSO (Winship, 1989) oder Enhancer-Lösungen zugegeben und verschiedene Polymerasen eingesetzt. Trotzdem konnte die komplette BUS-Sequenz nicht kloniert werden.

Ein Grund könnte sein, dass Sekundärstrukturen in der mRNA vorlagen, die die reverse Transkriptase behindern. So kann die RT-Reaktion nicht vollständig ablaufen und der Anker-Primer bindet stromabwärts vom tatsächlichen 5'-Ende. Oder der Primer bindet unspezifisch an eine interne Sequenz und erschwert dadurch die RT-Reaktion. Als dritte Möglichkeit käme ein partieller Abbau der mRNA durch Nukleasen in Frage. Dadurch wird die Matrize für die reverse Transkriptase verkürzt und das 5'-Ende nicht komplett in die cDNA umgeschrieben. Aus diesem Grund wurde in einem neuen Ansatz eine thermostabile reverse Transkriptase (Thermoscript; Life Technologies) eingesetzt. Dieses Enzym hat seine maximale Polymeraseaktivität bei höheren Temperaturen (bis 60 °C) und ist deshalb in der Lage, bei Sekundärstrukturen effektiver zu transkribieren. Die Synthese erfolgte wie in 3.2.8.1 beschrieben. Ausser dem oligo-dT Primer wurde für eine stringente RT-Reaktion ein genspezifischer Primer eingesetzt. Die gewonnene cDNA wurde anschließend als Matrize in die PCR eingebracht, jedoch konnten keine neuen Sequenzinformationen gewonnen werden. Eine weitere Möglichkeit, die vollständige BUS-cDNA zu amplifizieren, schien eine der RACE-PCR verwandte Methode zu sein. Mit Hilfe der terminalen Transferase (TdT) wurde eine 5'-cDNA synthetisiert (3.2.8.2). Das Enzym TdT addiert an das 5'-Ende einen oligo-dC-Rest, der eine Bindungsstelle für einen Ankerprimer darstellt. In der PCR-Reaktion wurde statt des RACE_{long/short} Primers ein AUAP-Primer und für die geschachtelte PCR ein AAP-Primer verwendet. Auch diese Methode blieb ohne Erfolg und führte nicht zu der erwünschten vollständigen BUS-cDNA.

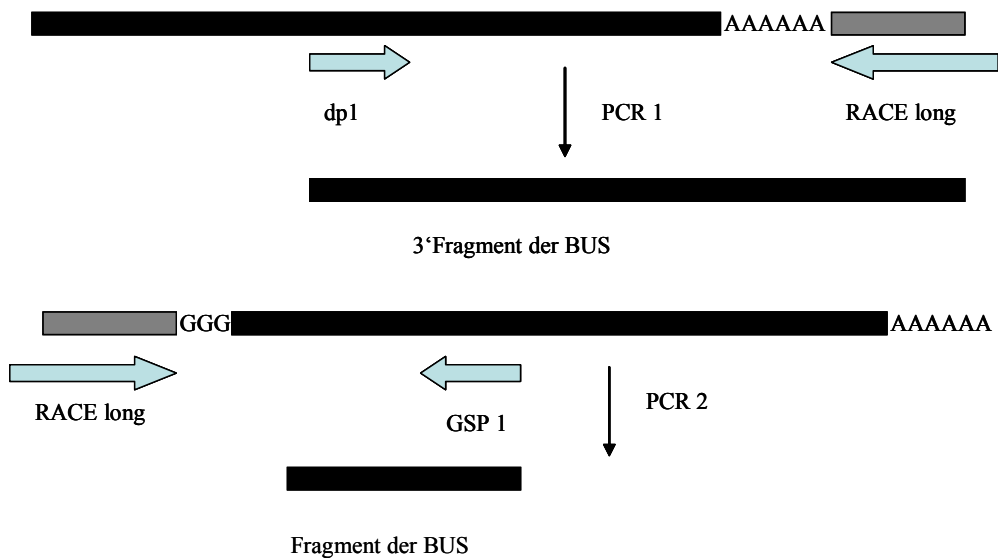


Abb. 4-17: Schema der PCR zur Amplifikation eines BUS-cDNA-Fragments

4.7.6 Amplifikation von BUS-Fragmenten mit genspezifischen Primern

Die VPSHum-Primer sind genspezifisch, konstruiert anhand der in der Datenbank veröffentlichten Basensequenz der Isovalerophenon-Synthase aus *Humulus lupulus*. Da die für BUS kodierende cDNA-Sequenz trotz der funktionellen Ähnlichkeit der beiden Enzyme unterschiedlich sein wird, wurde bei relativ niedrigen Annealing-Temperaturen gearbeitet. Der T_m der Primer lag bei 63 bzw. 64 °C. Allgemein wurde für die genspezifischen Primer eine Anlagerungs-Temperatur 5 °C unter dem Schmelzpunkt oder im Touchdown-Programm 5 °C über und unter dem T_m des Primerpaares gewählt.

Als Matrize für die PCR wurde die 3'-RACE-cDNA in Kombination mit dem VPSHum-sense- Primer eingesetzt. Als strangaufwärts gerichteter Primer diente VPSHum-anti oder der RACE_{long}-Primer. Die Anlagerungstemperatur wurde in einem Touchdown-PCR-Programm von 55 auf 50 °C reduziert oder im Standardprogramm bei 50 °C konstant gehalten. Es wurden mehrere PCR-Ansätze unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, ohne ein spezifisches Produkt zu erhalten. Die amplifizierten Fragmente entsprachen nicht der erwarteten Größe und eine anschließende Sequenzierung zeigte, dass es sich um Genfragmente handelte, die keine Homologie zu Vertretern der PKS-Familie aufwiesen.

4.7.7 Amplifikation von BPS-cDNAs

Da es nicht gelang, die vollständigen *H. calycinum*- und *H. perforatum*-BPS-cDNAs mit degenerierten Primern zu amplifizieren, wurden von der Nukleotidsequenz der kürzlich erfolgreich klonierten BPS-cDNA aus *H. androsaemum* (Liu et al., 2003) genspezifische Primer abgeleitet (5hbps2 und 3bps2). Die PCR erfolgte nach dem Touchdown-Verfahren beginnend bei 65 °C, wobei die Anlagerungs-Temperatur in den folgenden 10 Zyklen um jeweils 1 °C reduziert wurde. Es folgten 20 weitere Zyklen bei der zuletzt erreichten Temperatur. Als Matrize diente 1 µl der cDNA aus *H. calycinum*-Zellkulturen und parallel dazu wurde cDNA aus *H. perforatum*-Knospen eingesetzt (Abb. 4-18).

Diese PCR lieferte Produkte der erwarteten Größe. Nach der Aufklärung der Nukleotidabfolge wurden genspezifische Primer konstruiert (H.p.BPS100203sense; H.c.BPSGSP1/2anti) mit einer Überlappung von etwa 120 bp im mittleren Bereich der Sequenz. Nun wurde erneut amplifiziert, um die bei Verwendung der *H. androsaemum*-BPS-Primer eventuell falsch eingebauten Nukleotide zu eliminieren. Unter Verwendung des universellen RACE_{long}-Primers und eines GSP-Primers konnten Amplifikate erhalten werden, die zu der gesuchten Sequenz gehörten. Als Matrize diente dieselbe cDNA wie in der ersten Reaktion und zusätzlich 5'RACE-ready-cDNA aus beiden *Hypericum*-Arten.

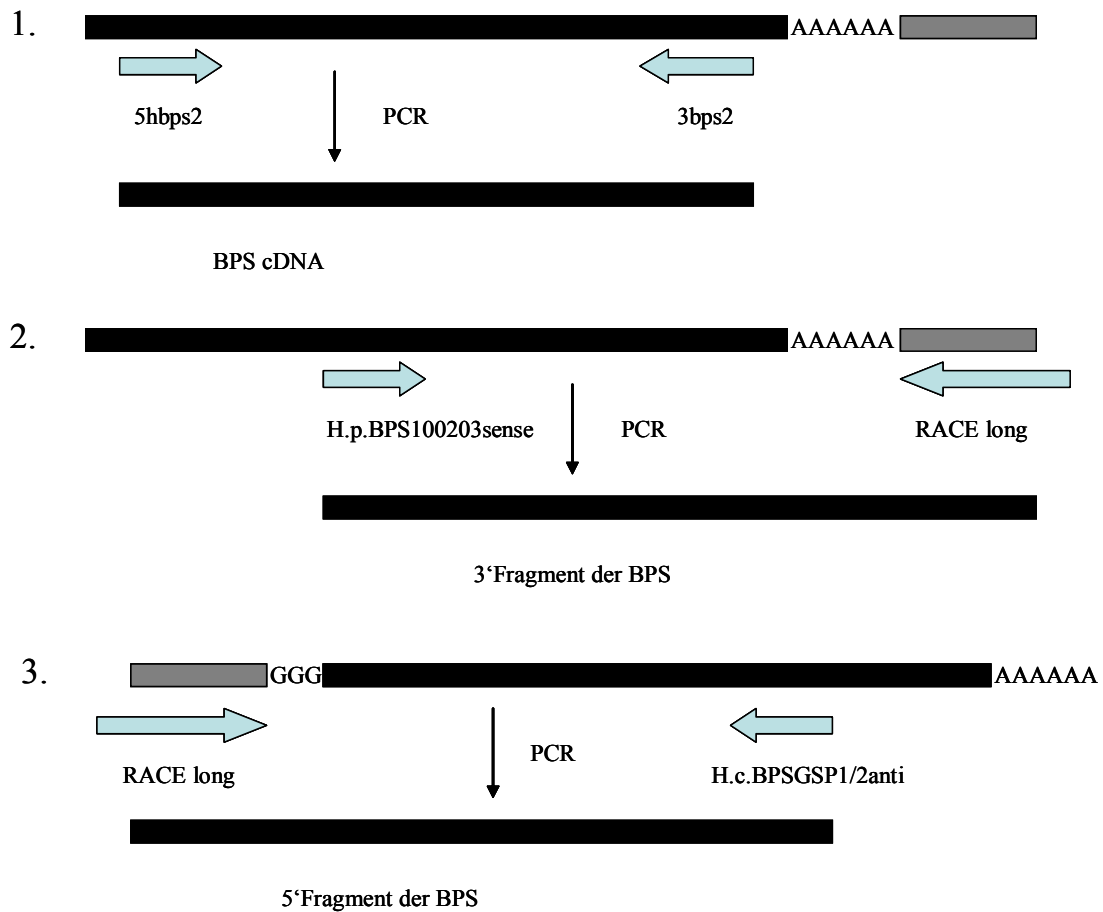


Abb. 4-18: Schema der PCR zur Amplifikation der BPS-cDNAs aus *H. calycinum* und *H. perforatum*

4.7.8 Gewinnung der vollständigen PKS-cDNAs

Die RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) stellt eine schnelle und sensitive Methode für die Amplifizierung der 5`- und 3`-Enden von cDNA dar.

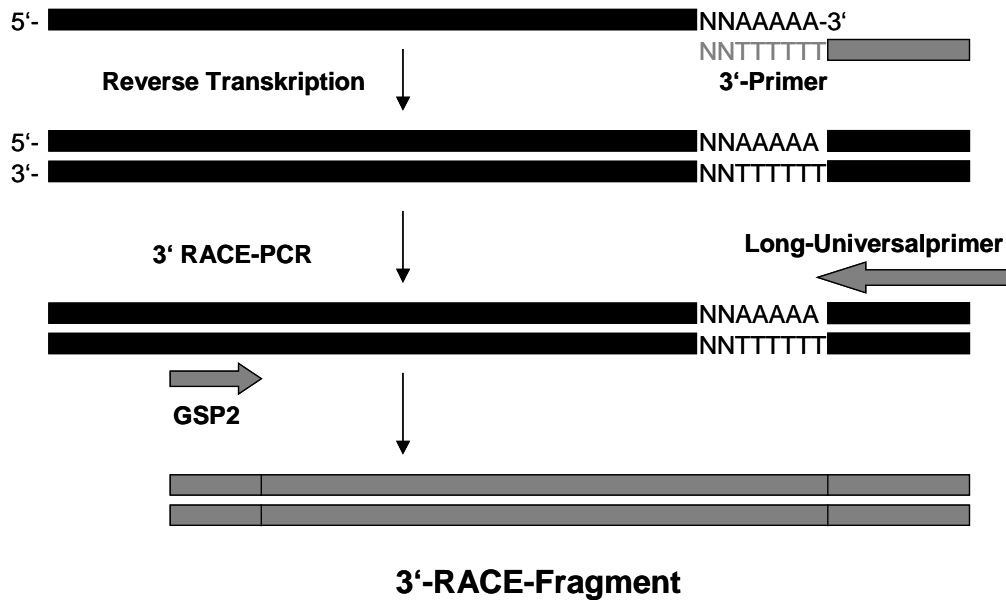


Abb. 4-19: Prinzip der 3'-RACE
 Der Long-Universalprimer war der RACE_{long}, ggbf. der RACE_{long/short} Primer.
 GSP2 war einer der genspezifischen Primer, konstruiert für das gegebene
 Fragment der PKS

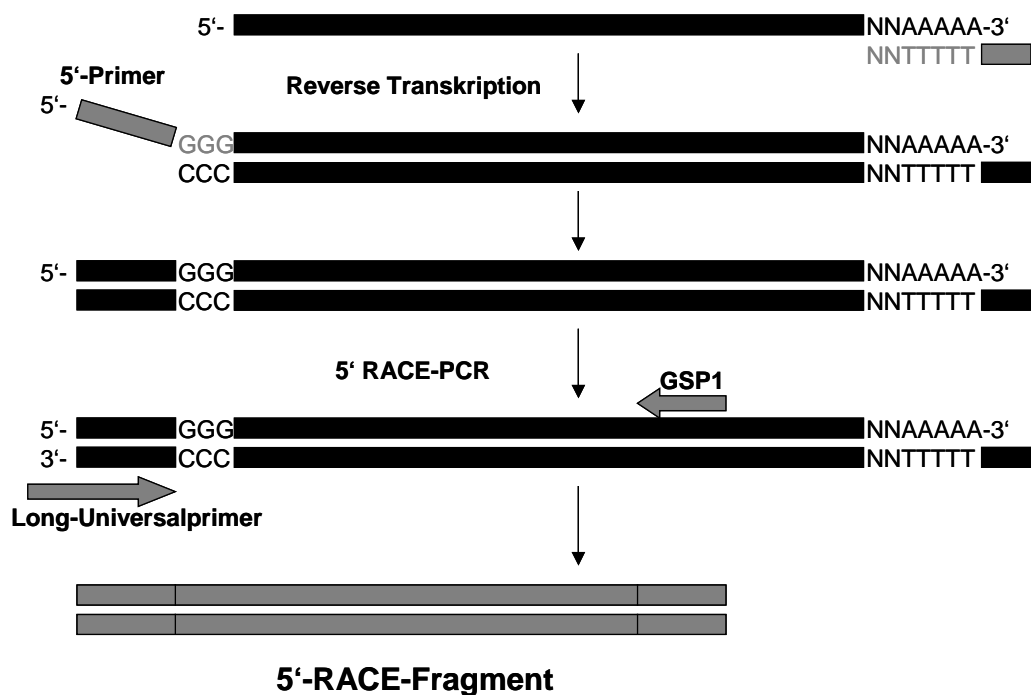


Abb. 4-20: Prinzip der 5'-RACE
 Der Long-Universalprimer war der RACE_{long}, ggbf. der RACE_{long/short} Primer.
 GSP2 war einer der genspezifischen Primer, konstruiert für das gegebene
 Fragment der PKS

Als Matrize für die PCR diene cDNA, die Primer-Hybridisierung erfolgte nach dem Touchdown-Verfahren beginnend bei 65 oder 55 °C, wobei die Anlagerungs-Temperatur in den ersten 10 Zyklen um jeweils 1 °C gesenkt wurde. Es folgten 20 weitere Zyklen bei der zuletzt erreichten Temperatur.

Falls in der ersten PCR ein universeller RACE_{long} und/oder RACE_{short} Primer verwendet wurde, enthielten diese PKS-Fragmente bereits den 3'-terminalen poly(A⁺)-Bereich und das stromaufwärts liegende Translationsstopcodon (Abb. 4-19).

Um das 5'-Ende der PKS zu synthetisieren, wurde für jedes Fragment ein genspezifischer *antisense*-Primer konstruiert. Durch Verwendung der SMART (Switching Mechanism At 5'End of RNA Transcript)-RACE-PCR konnte der offene Leserahmen von CHS und BPS aus *H. calycinum* und *H. perforatum* vollständig erhalten werden. Hier waren für die komplette Synthese mehrere Oligonukleotide erforderlich, da eine Amplifikation des 5'-Endes in einem Schritt nicht möglich war. Die Primer waren so gelegen, dass sie, um eine ausreichende Überlappung der ermittelten Sequenzen zu gewährleisten, jeweils mindestens 100 bp vor dem Ende der zuletzt gelesenen Sequenz ansetzten.

Um die gesuchten cDNAs für die CHS vollständig zu amplifizieren, wurden weitere genspezifische Primer synthetisiert (H.c.CHSGSP1sense; H.c.CHSGSP1anti; H.c.CHSGSP2sense; H.c.CHSGSP2anti). Die PCR mit diesen Primerpaaren lieferte Produkte, die im mittleren Bereich etwa 80 bzw. 130 bp überlappten, um die Teilsequenzen zuordnen zu können. Mit Hilfe des „SeqMan“ Programms konnten die resultierenden Teilsequenzen zu einer vorläufigen Gesamtsequenz zusammengefügt werden, so dass sie die kompletten ORFs für beide CHS-cDNAs enthielten.

4.7.9 Klonierung, Selektion und Sequenzierung

Die Größe der PCR-Produkte wurde immer mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft (3.2.10). Nach der Auftrennung wurde das cDNA-Fragment aus dem Gel eluiert und in den pGEM-T easy-Vektor der Firma Promega, den pCR2.1-TOPO-Vektor der Firma Invitrogen oder den selbst erstellten (3.2.11) T-Überhangvektor pBlueskript-dT ligiert (3.2.13). Da die *Taq*-Polymerase an die amplifizierte Sequenz ein Adenin anfügt, war keine Restriktion vor der Ligation notwendig. Nach der Transformation in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen wurden die Klone angezogen und selektiert (3.2.14.3).

Aus den erhaltenen Klonen wurde über alkalische Lyse die Plasmid DNA isoliert (3.2.15) und mit den dafür erforderlichen Restriktionsenzymen verdaut (für den am häufigsten

verwendeten pGEM-Vektor war das *EcoRI*). Alternativ wurde eine Kontroll-PCR für die einklonierten Fragmente durchgeführt. Mit zwei plasmidspezifischen Primern wurde die PCR nach einem Standardprotokoll gestartet. Der Restriktionsansatz oder das PCR-Produkt wurden auf einem Agarosegel (1 %) elektrophoretisch aufgetrennt und somit die Größe überprüft.

Die Plasmid-DNA wurde wie in 3.2.16 beschrieben nach der Dideoxyterminations-methode (Sanger et. al. 1977) sequenziert. In der Regel konnten dabei, abhängig von der Qualität der DNA und der elektrophoretischen Auftrennung, ca. 300-500 Basen pro Lauf gelesen werden. Die kompletten Sequenzen sind in Anlage I dargestellt.

4.7.10 Amplifikation von ORFs für die heterologe Expression

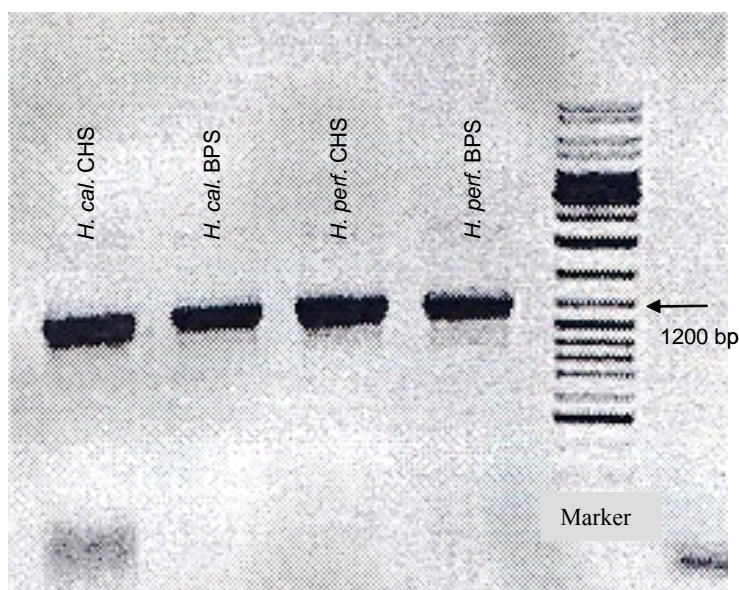
In den resultierenden CHS- und BPS-cDNAs für *H. perforatum* und *H. calycinum* wurden mit dem Programm „Editseq“ die offenen Leserahmen, d.h. die für die Enzyme kodierenden Basensequenzen, lokalisiert.

Es wurden Expressionsprimer konstruiert (2.1.6), die jeweils eine Restriktionsschnittstelle (*KpnI*) enthielten, um den ORF in den Expressionsvektor in *sense*-Richtung ligieren zu können. Nun konnten die CHS- und die BPS-ORFs amplifiziert werden. Da bei der herkömmlichen PCR mit *Taq*-Polymerase eine Fehlerrate von $8,0 \times 10^{-6}$ auftritt, wurde die wesentlich genauere *Pfu*, *Pwo* oder *Pfx*-DNA-Polymerase eingesetzt. Diese Polymerasen besitzen eine ausgeprägte 3'→5' Exonuclease-Aktivität und die Fehlerrate liegt z.B. für die *Pfu*-Polymerase bei $1,3 \times 10^{-6}$ (Cline et al., 1996). Im Gegensatz zu der *Taq*-Polymerase fügt die *Pfu*-Polymerase an die amplifizierte Sequenz kein Adenin an, so dass das Produkt glatte Enden (blunt ends) aufweist.

Als Matrize für die PCR dienten cDNA-Präparationen, die zu mRNA aus *H. calycinum*-Zellkulturen und *H. perforatum*-Knospen komplementär waren. Zudem wurde MgSO_4 in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen beeinflusst die Anlagerung der Primer und die Denaturierung der Matrize sowie die Aktivität und Genauigkeit der DNA-Polymerase. Mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration nimmt der Anteil unspezifischer Produkte zu, mit abnehmender Mg^{2+} -Konzentration nimmt die Ausbeute ab (Saiki, 1988). Die anschließende PCR wurde mit einer MgSO_4 -Konzentration von 1,5 mM durchgeführt. Die Hybridisierungs-Temperatur betrug 60 °C. Es wurden folgende Primer verwendet:

Tab. 4-3: Primerkombinationen für die Amplifikation der PKS-ORFs

<i>Amplifikat (ORF)</i>	<i>Primer 1</i>	<i>Primer 2</i>
H.p. CHS	5hbp070102	3hbp-H.p.
H.p. BPS	5hbps-2	3bps-2
H.c. CHS	5hbp070102	3hbp
H.c. BPS	5hbps-2	3bps-2-H.c.

**Abb. 4-21:** Agarose-Gelelektrophorese der vier klonierten PKS-ORFs

Mit Hilfe des Programms „Editseq“ wurden die Basensequenzen in die Aminosäuresequenzen umgeschrieben und die Molekülmassen der resultierenden Polypeptide errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst.

Tab. 4-4: Eigenschaften der klonierten PKS

	Aminosäuren	Basen	M [Da]	Isoel. Punkt
H. p.CHS	389	1170	42706	6,4
H. c.CHS	390	1173	42752	6,4
H. c.BPS	395	1188	42737	5,9
H. p.BPS	391	1176	42339	6,3

Die mittels Gelextraktion aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym *KpnI* verdaut. Zuvor wurden die entsprechenden PKS-Sequenzen auf das Vorkommen der

KpnI-Schnittstelle überprüft. Anschließend wurden sie in den mit *StuI* und *KpnI* geschnittenen Expressionsvektor pGEX-G kloniert und zur Vermehrung in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Restriktionsendonuklease *StuI* generiert glatte Enden, so dass kein „Verdau“ der einzuklonierenden Gene mit diesem Enzym notwendig war.

Die pGEX-Vektoren der Firma Amersham Biosciences enthalten einen tac-Promotor für die chemisch induzierbare Expression mit hoher Protein-Ausbeute und ein internes lac^q-Gen, um die Expression in allen *E. coli*-Wirtszellen zu ermöglichen. Zusammen mit dem einklonierten Insert wird die Glutathion-S-Transferase koexprimiert, die eine einfache Reinigung des gewonnenen Enzyms ermöglicht (3.1.8.2). Da der 4952 bp große Vektor pGEX-3X keine Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *StuI* und *KpnI* enthält, mussten diese in seine Sequenz eingeführt werden. Das pGEX-G-Plasmid wurde nach Smith und Johnson (1988) synthetisiert. Damit ist es möglich, exakt die Peptidbindung zwischen dem rekombinanten Protein und dem GST-Fusionsteil zu spalten, so dass kein Überhang am N-Terminus verbleibt.

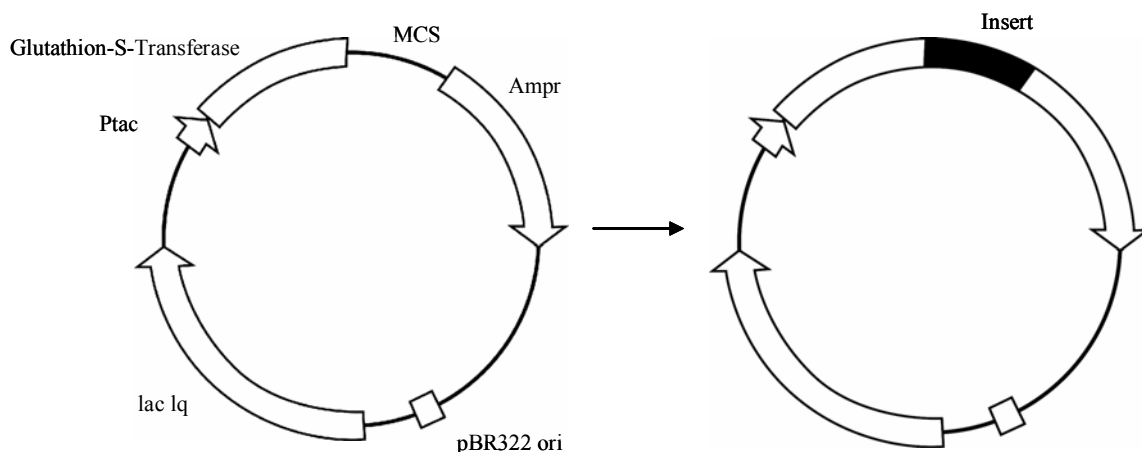


Abb. 4-22: Expressionsvektor pGEX-G

Nach einer 12-20 stündigen Kultivierung der Bakterien auf LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol als Selektionsmarker wurde aus den positiven Klonen die Plasmid-DNA isoliert.

Mit den vektorspezifischen Primern (5'pGEXseq. und 3'pGEXseq.) wurde eine erste Sequenzierung in beiden Richtungen durchgeführt. Da die CHS- und BPS-cDNAs für die vollständige Sequenzierung zu lang waren, wurden zusätzliche stromaufwärts sowie stromabwärts gelegene Primer konstruiert (BPS(5')rev., BPS(3')sen., CHS(5')rev.,

CHS(3')sen.), um die kompletten ORFs abzudecken. Die sich teilweise überlappenden Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme „Seqman“ und „Editseq“ verglichen und Fehler korrigiert. In der Anlage I sind die gesamten sequenzierten Bereiche dargestellt.

4.8 Heterologe Expression der klonierten PKS

Um die Aufreinigung der rekombinanten Enzyme einfach und schnell über Affinitätschromatographie zu ermöglichen, wurden sie in Fusion mit der Glutathion-S-Transferase exprimiert (3.2.17). Folgende Expressionsplasmide wurden erzeugt und in den *E. coli* Stamm BL21 eingebracht:

pGEX-G H.p.CHS

pGEX-G H.p.BPS

pGEX-G H.c.CHS

pGEX-G H.c.BPS

Vier Stunden nach Induktion mit IPTG wurden die Bakterien geerntet und durch Ultraschall oder enzymatische Lyse aufgebrochen (3.2.17.2). Die anschließende Zentrifugation trennte die lösliche von der unlöslichen Proteinfraction. Beide Methoden des Bakterienaufschlusses zeigten eine ähnlich gute Ausbeute an Protein. Ob frisch geerntete oder bei -20 °C gelagerte Bakterien zur Isolierung verwendet wurden, hatte keinen Einfluss auf Enzymausbeute und -aktivität.

Die Expressionsbedingungen wurden so gewählt, dass eine hohe Menge an Protein gelöst vorlag und enzymatische Aktivität aufwies. Es musste verhindert werden, dass sich die überexprimierten Proteine falsch falten, dann aggregieren und unlöslich sind. Durch Wechselwirkung der hydrophoben Bereiche der Proteinoberfläche entstehen sogenannte „Inclusion Bodies“. Die Effizienz der heterologen Expression wurde durch SDS-PAGE von Aliquots der Zellsuspension vor und nach Induktion überprüft (Abb. 4-24).

4.8.1 Affinitätschromatographie der rekombinanten PKS

Frisch gewonnene Proteinextrakte aus transformierten Bakterien wurden präparativ mittels Affinitätschromatographie getrennt (3.1.8.2). Das an die Säule gebundene Fusionsprotein wurde mit Glutathion eluiert (Abb. 4-23). Die Konzentration des isolierten rekombinanten Proteins wurde nach Bradford (3.1.10.3) bestimmt.

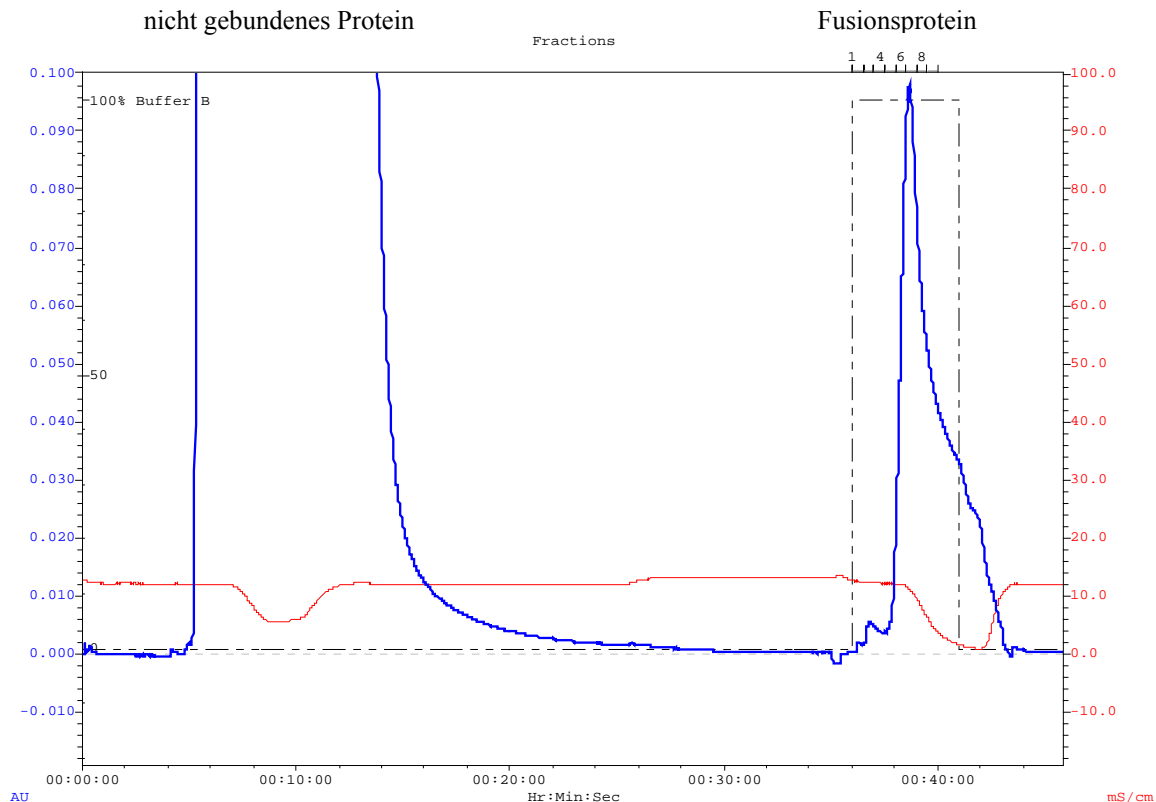


Abb. 4-23: Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanter *H. calycinum*-BPS

Der GST-Fusionsteil beträgt 26 kDa und kann mit dem Faktor Xa abgespalten werden (3.2.17.3). Es zeigte sich allerdings, dass niedrige Konzentrationen des Faktors Xa (1 U/mg Protein) die Fusionsproteine nicht ausreichend spalten und höhere Konzentrationen (10 U/mg Protein) die Aktivität der rekombinanten PKS stark reduzieren. Frühere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe (Liu et al., 2003) zeigten, dass der Fusionsanteil die enzymatische Aktivität und Spezifität nicht beeinflusst, daher wurde in den weiteren Arbeiten auf die Abspaltung verzichtet.

4.8.2 Kontrolle der heterologen Expression

Zur Kontrolle der Überexpression und der Effektivität der Aufreinigung wurden die rekombinanten Proteine über SDS-PAGE analysiert (3.1.12). Das Elektrophoresegel ist ein Molekularsieb, das aus langen Polymeren des Acrylamids besteht, die durch Bisacrylamid quervernetzt sind. Proteine werden durch Erhitzen in Gegenwart von β -Mercaptoethanol und SDS denaturiert. SDS lagert sich an die Proteine an, die dadurch eine einheitliche negative Ladung erhalten, die in einem direkten Verhältnis zu ihrer Masse steht. Die Eigenladung der

Proteine ist dadurch vollständig überdeckt und die Wanderungsgeschwindigkeit hängt nur von ihren Molekülmassen ab.

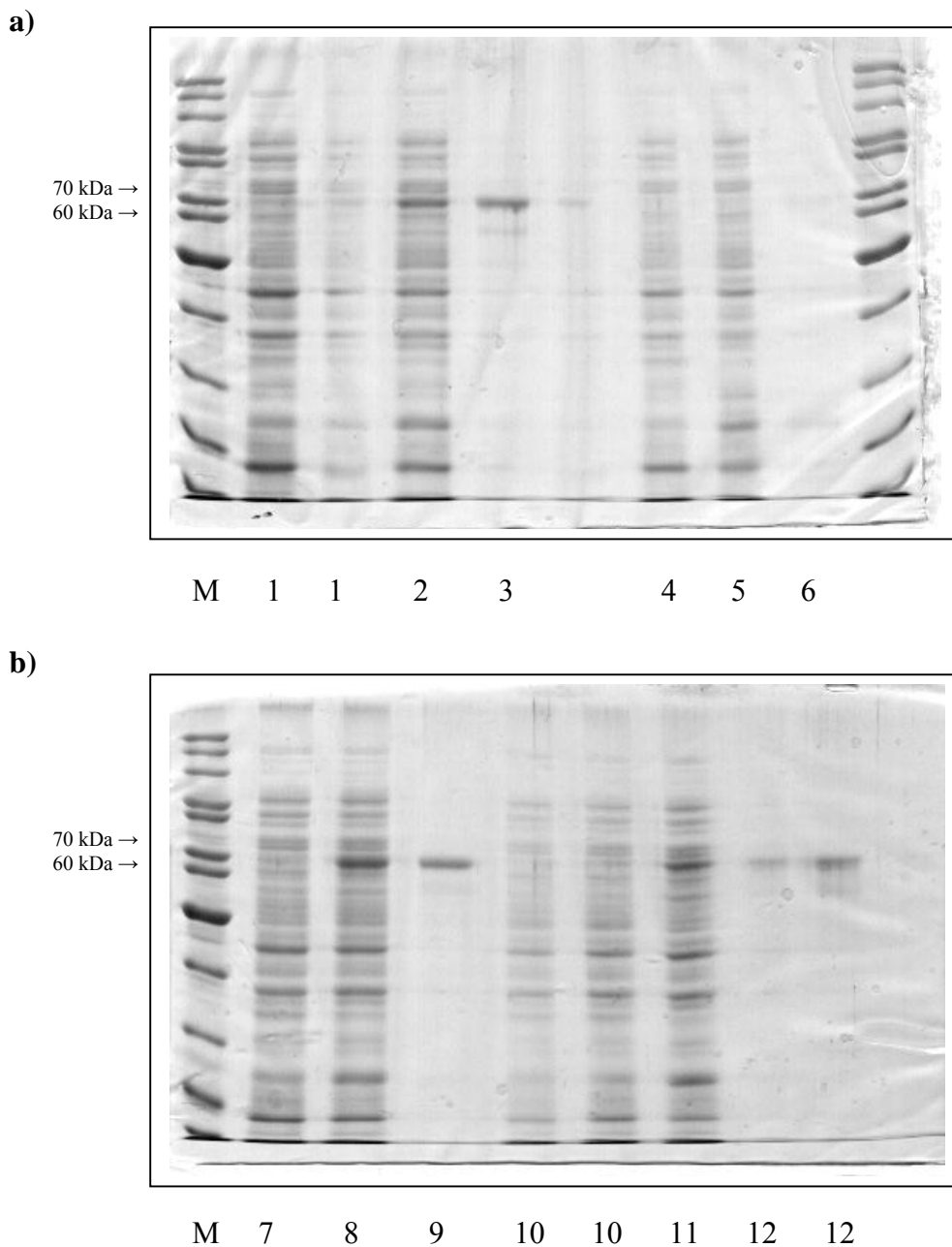


Abb. 4-24: SDS-PAGE von Bakterienextrakten und gereinigten PKS

a) 1-3: *H. calycinum*-CHS

Spur 1: vor Induktion, Spur 2: nach Induktion, Spur 3: gereinigte CHS

4-6: *H. calycinum*-BPS

Spur 4: vor Induktion, Spur 5: nach Induktion, Spur 6: gereinigte BPS

b) 7-9: *H. perforatum*-CHS

Spur 7: vor Induktion, Spur 8: nach Induktion, Spur 9: gereinigte CHS

10-12: *H. perforatum*-BPS

Spur 10: vor Induktion, Spur 11: nach Induktion, Spur 12: gereinigte BPS

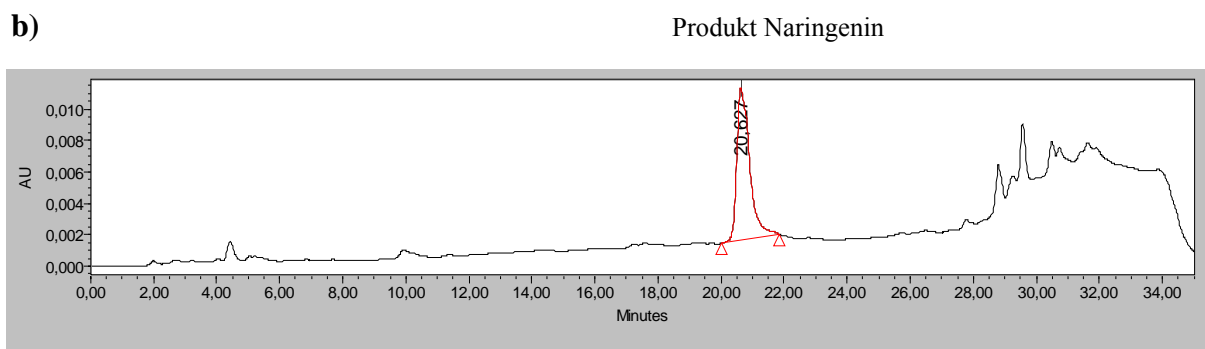
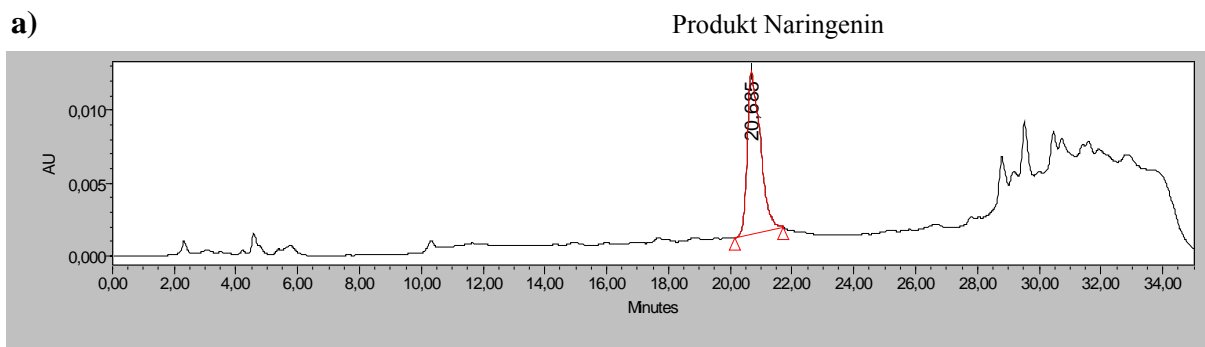
M = Größenmarker

Im SDS-Gel ist nach Coomassie-Färbung (3.1.12.2) für alle vier Proteine bei ca. 68 kDa eine deutliche Bande zu sehen, nachdem die Expression mit IPTG stimuliert wurde. Vor der Induktion sind die Proteine im Zellextrakt nicht vorhanden.

4.9 Überprüfung der Aktivität der rekombinanten PKS

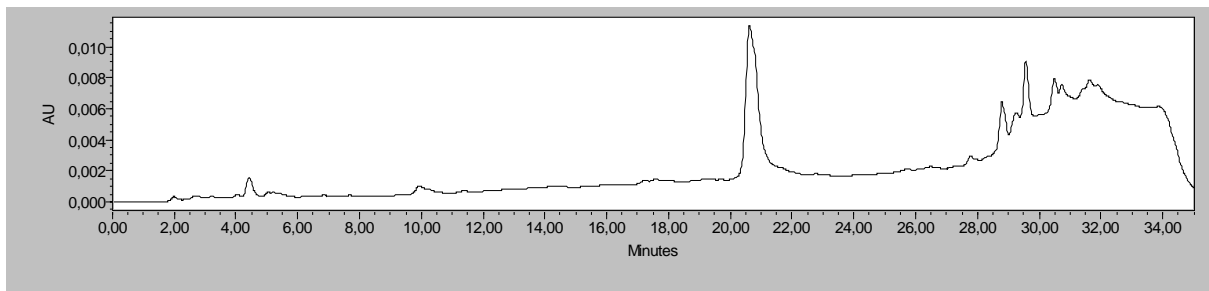
Die rekombinanten Enzyme wurden in Gegenwart von Malonyl-CoA jeweils mit den drei relevanten Starter-Substraten inkubiert.

Beide CHS zeigten Aktivität mit p-Cumaroyl-CoA (Abb. 4-25). Die BPS aus *H. calycinum* war mit Benzoyl-CoA aktiv (Abb. 4-26). Nach der Inkubation der vermutlichen BPS aus *H. perforatum* konnte leider keine Bildung des Benzophenons nachgewiesen werden. Das Enzym war inaktiv.



c)

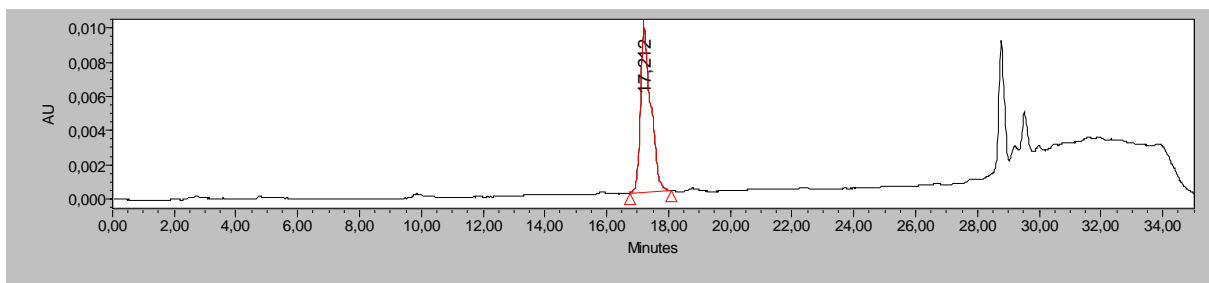
Referenz Naringenin

**Abb. 4-25:** HPLC-Analyse der Inkubationen mit rekombinanten CHS

- a) *H. calycinum*-CHS mit p-Cumaroyl-CoA
- b) *H. perforatum*-CHS mit p-Cumaroyl-CoA
- c) Referenz Naringenin

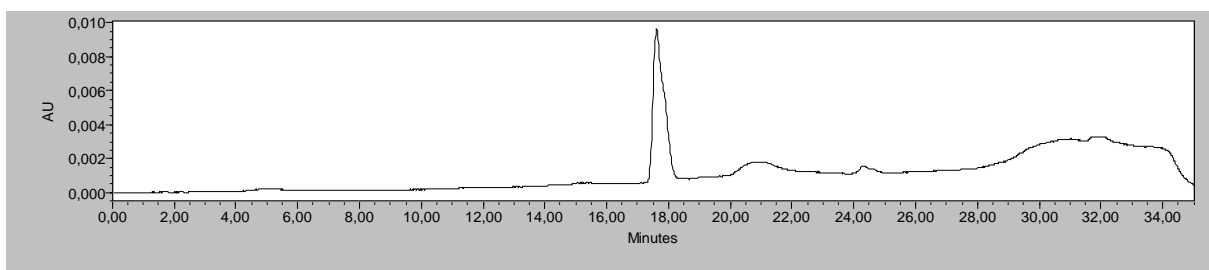
a)

Produkt Phlorbenzophenon



b)

Referenz Phlorbenzophenon

**Abb. 4-26:** HPLC-Analyse der Inkubationen mit rekombinanter BPS

- a) *H. calycinum*-BPS mit Benzoyl-CoA
- b) Referenz Phlorbenzophenon

4.10 Charakterisierung der rekombinanten Enzyme

Da zumindest drei der vier überexprimierten PKS aktiv waren, wurden ihr Substratspektrum, Temperatur- und pH-Optimum sowie ihre Stabilität und kinetische Daten ermittelt.

4.10.1 Temperatur-, pH- und DTT-Abhängigkeit sowie Substratspezifität

Die relative Aktivität einer enzymatischen Reaktion steigt bis zu einer bestimmten Temperatur an. Bei höheren Temperaturen werden durch zu große thermische Bewegung die intramolekularen Bindungen, die die Proteinstruktur stabilisieren, zerstört. Die CHS und BPS wurden bei 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45 °C inkubiert und die gebildete Menge der Produkte mittels HPLC bestimmt.

Neben der Temperatur hat der pH-Wert eine entscheidende Auswirkung auf die Enzymaktivität. Säuren und Basen beeinflussen die Ladung der Aminosäuren und zerstören die zur Funktion notwendige Konformation. Die bekannten PKS III besitzen ein pH-Optimum von etwa 7, deshalb wurden für die Inkubationen Phosphatpuffer pH 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8 und 8,5 eingesetzt. Die Produkte wurden mittels HPLC analysiert.

Eine weitere wichtige Komponente einer PKS-Inkubation ist das DTT (Dithiothreitol; 1,4-Dimercapto-2,3-Butandiol), eine reduzierende Substanz, die die SH-Gruppen im Enzymmolekül stabilisiert. Falls sich Disulfidbrücken bilden, werden diese durch DTT via gemischtes Disulfid reduziert. Die rekombinanten PKS wurden nach dem Standardprotokoll (3.1.10.5) unter Zusatz von 0, 10, 20, 50 oder 100 µM DTT inkubiert. Außerdem enthielt jeder Ansatz [2-¹⁴C] Malonyl-CoA (0,93 kBq). Das extrahierte Produkt wurde mittels DC getrennt (3.1.3) und mit Hilfe des Radioscanners Rita quantifiziert (3.1.9).

Neben absolut substratspezifischen Enzymen gibt es solche, die auch andere Verbindungen mit ähnlichen Strukturmerkmalen umsetzen. Die rekombinanten PKS wurden mit dem jeweiligen bevorzugten Starter-Substrat (4.9) und verwandten aromatischen sowie aliphatischen Substraten inkubiert. Die Reaktion wurde nach dem Standardprotokoll mit 2 µg Enzym und Zusatz von [2-¹⁴C] Malonyl-CoA durchgeführt und anschließend detektiert (3.1.3 und 3.1.9).

4.10.2 Enzymkinetik

Für die Charakterisierung eines Enzyms spielen weiterhin die kinetischen Größen wie Substrataffinität (K_m) und Wechselzahl ($V_{max}/[Enzym]$, auch K_{cat} genannt) eine große Rolle. Je größer der K_{cat} -Wert und je kleiner der K_m -Wert, desto größer ist die katalytische Effizienz (K_{cat}/K_m).

Die Michaelis-Kostante (K_m) bezeichnet die Substratkonzentration, bei der die Umsatzgeschwindigkeit $v = V_{max}/2$ beträgt. Die Messungen erfolgten in einem 250 µl Ansatz,

wobei die Substratkonzentration von 0,2 bis etwa $5 \times K_m$ anstieg. Das zweite Substrat lag jeweils in Sättigung vor. Die Proteinkonzentration war konstant, für jede Inkubation wurden 2 µg der rekombinanten CHS oder BPS eingesetzt. Die Reaktion erfolgte unter den zuvor ermittelten optimalen Bedingungen (4.10.1). Nach 20 min wurde das gebildete Produkt mit Ethylacetat ausgeschüttelt und bis zur Trockne eingengt. Die quantitative Analyse erfolgte mittels HPLC.

4.11 Charakterisierung der rekombinaten Chalkon-Synthase aus *Hypericum perforatum* (H.p.CHS)

4.11.1 Temperatur-, pH- und DTT-Abhängigkeit sowie Substratspezifität

Für die H.p.CHS lag die optimale Temperatur bei 35 °C (Abb. 4-27). Alle weiteren Experimente zur ihrer Charakterisierung wurden bei dieser Temperatur durchgeführt. Die Produktbildung war über 20 min. linear.

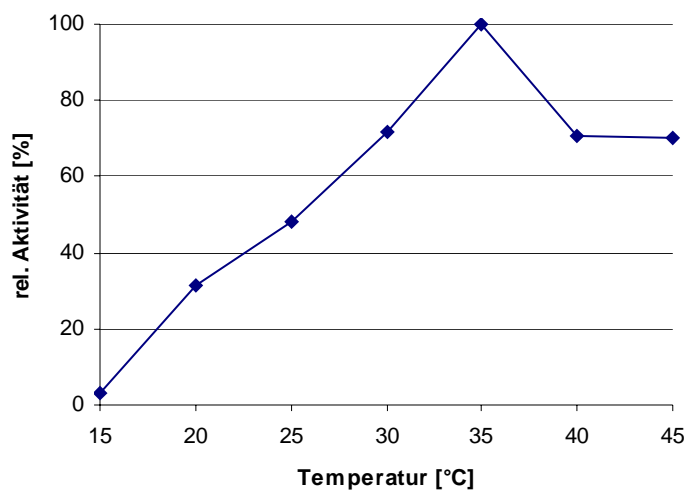


Abb. 4-27: Temperaturoptimum der *H. perforatum*-CHS

Der optimale pH-Wert wurde bei pH 8 gefunden (Abb. 4-28).

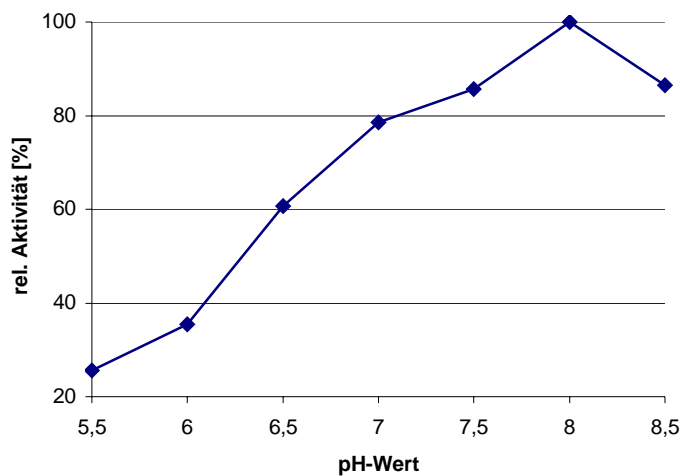


Abb. 4-28: pH-Optimum der *H. perforatum*-CHS

Um den Einfluss von DTT auf die CHS-Aktivität zu überprüfen, wurde es in fünf verschiedenen Konzentrationen dem Inkubationspuffer zugesetzt. Im Ansatz mit 50 μ M DTT wurde die maximale enzymatische Aktivität detektiert. Ohne DTT-Zusatz war die Aktivität um etwa 30 % reduziert.

Bezüglich der Substratspezifität wurde die höchste Umsatzrate mit p-Cumaroyl-CoA erzielt (Tab. 4-5). Neben diesem bevorzugten Starter-Substrat wurde auch das strukturell ähnliche Cinnamoyl-CoA umgesetzt. Es wurden keine Nebenprodukte detektiert. Als weitere Substrate fungierten, mit abnehmender relativer Aktivität, Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA, Butyryl-CoA und Isovaleryl-CoA. Die hierbei auftretenden Nebenprodukte konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Acetyl-CoA, Hexanoyl-CoA, Octanoyl-CoA und hydroxylierte Benzoyl-CoA-Derivate wurden nicht akzeptiert.

Tab. 4-5: Substratspezifität der CHS aus *H. perforatum*

Substrat	Relative Aktivität [%]	Nebenprodukte [% der Naringenin-Menge]
p-Cumaroyl-CoA	100	-
Cinnamoyl-CoA	17,3	-
Benzoyl-CoA	20,9	23,2; 14,3
o-Hydroxybenzoyl-CoA	0	-
m-Hydroxybenzoyl-CoA	0	-
p-Hydroxybenzoyl-CoA	0	-
Acetyl-CoA	0	-
Butyryl-CoA	13,1	10,9
Isobutyryl-CoA	22,9	39,8
Isovaleryl-CoA	9,2	8,3
Hexanoyl-CoA	0	-
Octanoyl-CoA	0	-

4.11.2 Enzymkinetik

Für das bevorzugte Starter-Substrat p-Cumaroyl-CoA und den Kettenverlängerer Malonyl-CoA wurden die K_m -, K_{cat} - und K_{cat}/K_m -Werte ermittelt.

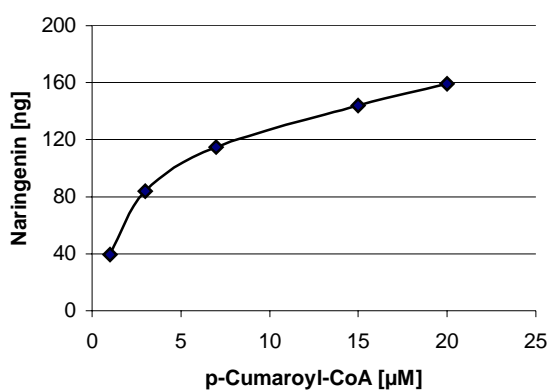


Abb. 4-29: Michaelis-Menten-Kinetik für p-Cumaroyl-CoA (*H. perforatum*-CHS)

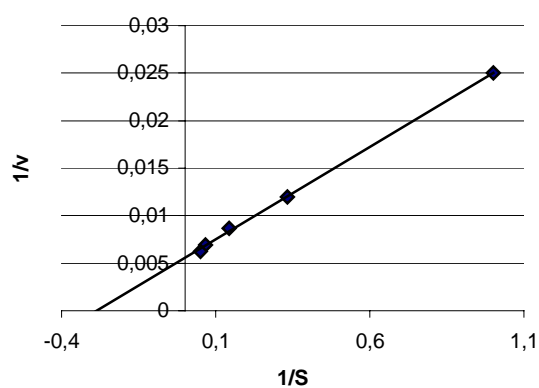


Abb. 4-30: Bestimmung des K_m -Werts für p-Cumaroyl-CoA nach Lineweaver-Burk

Da der K_m -Wert aus einer asymptotisch verlaufenden Kurve nach Michaelis und Menten (Abb. 4-29 und 4-31) nur ungenau ablesbar ist, ist es sinnvoll, sich einer linearisierten Darstellung zu bedienen. Aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ergab sich für p-Cumaroyl-CoA nach Lineweaver-Burk ein K_m -Wert von $3,6 \mu\text{M}$ (Abb. 4-30) und nach Hanes ein K_m -Wert von $3,9 \mu\text{M}$. Nach Eadie-Hofstee lag der K_m -Wert bei $3,7 \mu\text{M}$. Der K_{cat} -Wert war $2,01 \text{ min}^{-1}$. Daraus errechnete sich ein K_{cat}/K_m -Wert von $9300 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$.

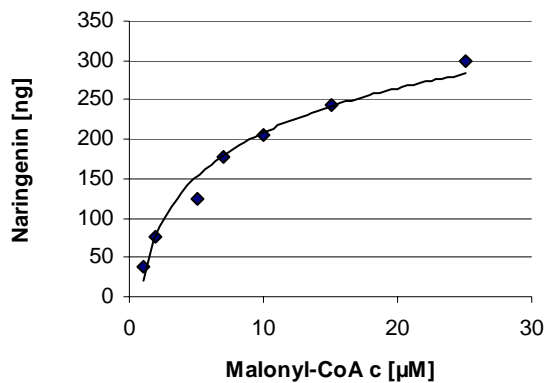


Abb. 4-31: Michaelis-Menten-Kinetik für Malonyl-CoA (*H. perforatum*-CHS)

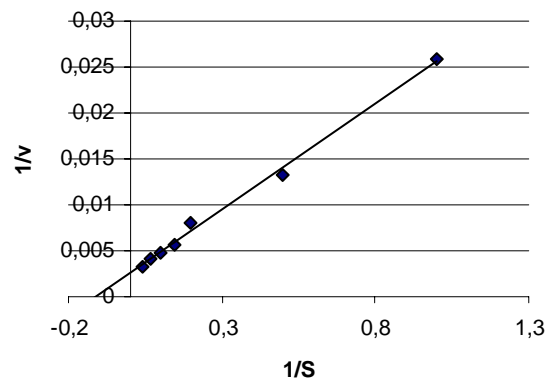


Abb. 4-32: Bestimmung des K_m -Werts für Malonyl-CoA nach Lineweaver-Burk

Für Malonyl-CoA ergab sich nach Lineweaver-Burk ein K_m von $9,1 \mu\text{M}$, nach Hanes von $9,8 \mu\text{M}$ und nach Eadie-Hofstee von $9,3 \mu\text{M}$ (Abb. 4-32).

4.12 Charakterisierung der rekombinaten Chalkon-Synthase aus *Hypericum calycinum* (H.c.CHS)

4.12.1 Temperatur-, pH- und DTT-Abhängigkeit sowie Substratspezifität

Die höchste Aktivität der H.c.CHS wurde bei 35°C detektiert (Abb. 4-33). Die Produktbildung war über 20 min. linear.

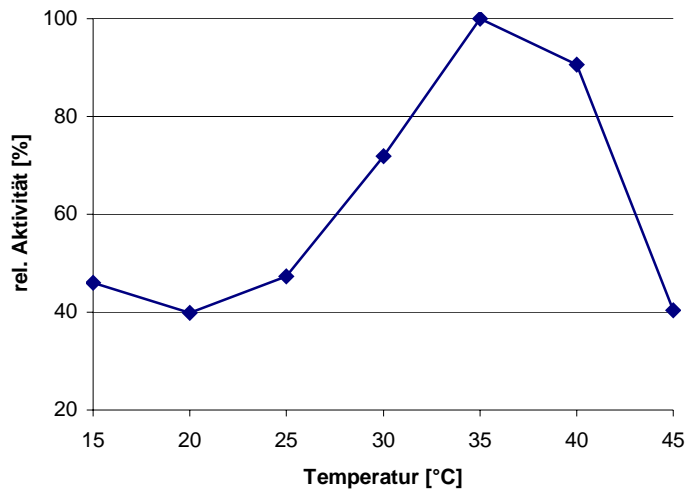


Abb. 4-33: Temperaturoptimum der *H. calycinum*-CHS

Der optimale pH-Wert für dieses Enzym lag bei 7,5 (Abb. 4-34).

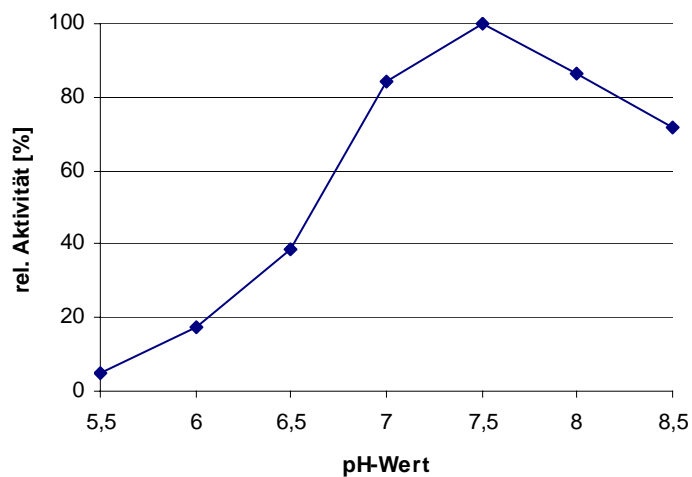


Abb. 4-34: pH-Optimum der *H. calycinum*-CHS

Die optimale DTT-Konzentration lag bei 50 μ M. Ohne DTT war die Aktivität um etwa 40 % reduziert.

Das bevorzugte Substrat war p-Cumaroyl-CoA, es wurden keine Nebenprodukte detektiert (Tab. 4-6). Weniger effizient wurden Benzoyl-CoA, Butyryl-CoA, Isovaleryl-CoA, Isobutyryl-CoA und Cinnamoyl-CoA akzeptiert, wobei auch Nebenprodukte auftraten. Acetyl-CoA, Hexanoyl-CoA, Octanoyl-CoA und hydroxylierte Benzoyl-CoA-Derivate wurden nicht umgesetzt.

Tab. 4-6: Substratspezifität der CHS aus *H. calycinum*

Substrat	Relative Aktivität [%]	Nebenprodukte [% der Naringenin-Menge]
p-Cumaroyl-CoA	100	-
Cinnamoyl-CoA	9,1	-
Benzoyl-CoA	20,15	16,0
o-Hydroxybenzoyl-CoA	0	-
m-Hydroxybenzoyl-CoA	0	-
p-Hydroxybenzoyl-CoA	0	-
Acetyl-CoA	0	-
Butyryl-CoA	16,5	4,6
Isobutyryl-CoA	10,8	6,2
Isovaleryl-CoA	12,2	6,2
Hexanoyl-CoA	0	-
Octanoyl-CoA	0	-

4.12.2 Enzymkinetik

Für die Substrate p-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA wurden die K_m -, K_{cat} - und K_{cat}/K_m -Werte gemessen. Die Reaktion erfolgte unter den zuvor ermittelten optimalen Bedingungen (4.12.1).

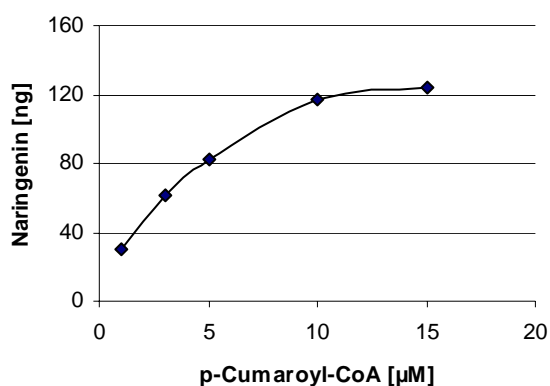


Abb. 4-35: Michaelis-Menten-Kinetik für p-Cumaroyl-CoA (*H. calycinum*-CHS)

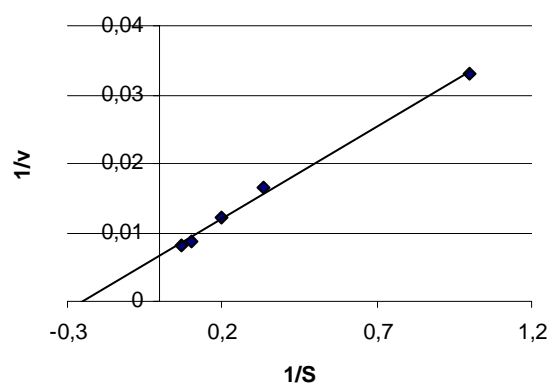


Abb. 4-36: Bestimmung des K_m -Werts für p-Cumaroyl-CoA nach Lineweaver-Burk

Aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ergab sich für p-Cumaroyl-CoA nach Lineweaver-Burk ein K_m -Wert von 4,0 μM und nach Hanes ein K_m -Wert von 4,8 μM (Abb. 4-36). Nach Eadie-Hofstee war der K_m -Wert 4,6 μM .

Der K_{cat} -Wert war 1,57 min^{-1} . Daraus errechnete sich ein K_{cat}/K_m -Wert von 6541 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$.

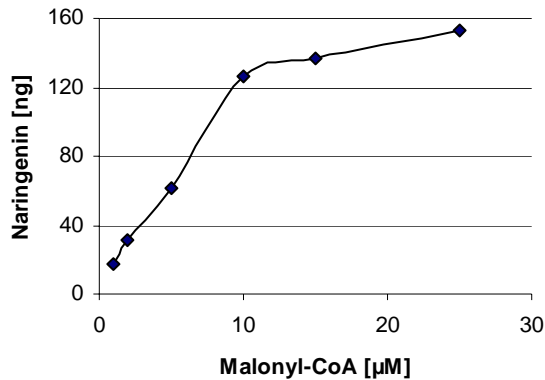


Abb. 4-37: Michaelis-Menten-Kinetik für Malonyl-CoA (*H. calycinum*-CHS)

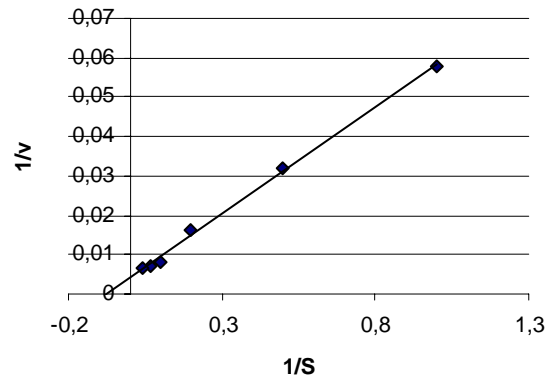


Abb. 4-38: Bestimmung des K_m -Wertes für Malonyl-CoA nach Lineweaver-Burk

Für Malonyl-CoA ergab sich nach Lineweaver-Burk ein K_m -Wert von 13,8 μM , nach Hanes ein K_m -Wert von 12,6 μM und nach Eadie-Hofstee ein K_m -Wert von 15,7 μM (Abb. 4-38).

4.13 Charakterisierung der rekombinaten Benzophenon-Synthase aus *Hypericum calycinum* (H.c.BPS)

4.13.1 Temperatur-, pH- und DTT-Abhängigkeit sowie Substratspezifität

Die maximale BPS-Aktivität wurde bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C detektiert (Abb. 4-39). Die Produktbildung war über 20 min. linear.

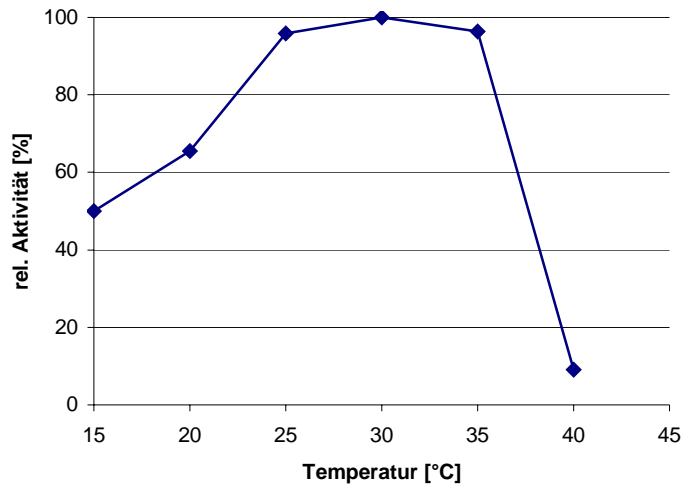


Abb. 4-39: Temperaturoptimum der *H. calycinum*-BPS

Der optimale pH-Wert für dieses Enzym lag bei 7 (Abb. 4-40).

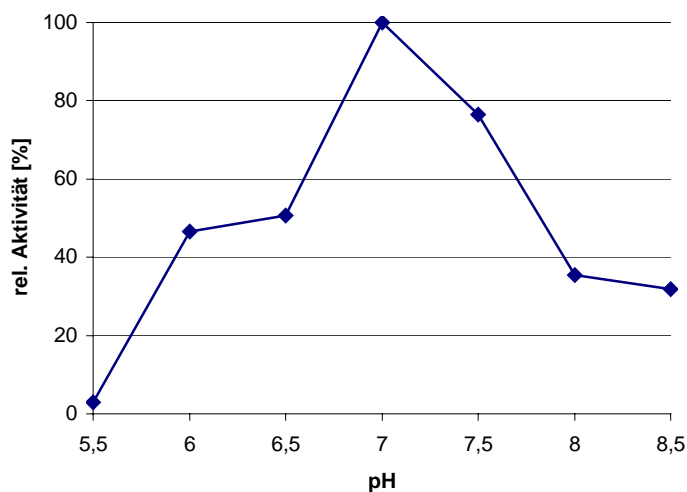


Abb. 4-40: pH-Optimum der *H. calycinum*-BPS

Die optimale DTT-Konzentration lag bei 10 μ M. Ohne DTT war die Aktivität um etwa 40 % reduziert.

Das bevorzugte Starter-Substrat für die *H.c.BPS* war Benzoyl-CoA, wobei auch ein hoher Anteil an Nebenprodukt auftrat (Tab. 4-7). Weiter wurden Butyryl-CoA, Isobutyryl-CoA, Isovaleryl-CoA und Hexanoyl-CoA umgesetzt. Minimal wurde auch p-Cumaroyl-CoA akzeptiert. Die Nebenprodukte konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr identifiziert werden.

Tab. 4-7: Substratspezifität der H.c.BPS

Substrat	Relative Aktivität [%]	Nebenprodukte [% der Phlorbenzophenon- Menge]
p-Cumaroyl-CoA	4	-
Cinnamoyl-CoA	0	-
Benzoyl-CoA	100	93,9
o-Hydroxybenzoyl-CoA	0	-
m-Hydroxybenzoyl-CoA	0	-
p-Hydroxybenzoyl-CoA	0	-
Acetyl-CoA	0	-
Butyryl-CoA	30,3	-
Isobutyryl-CoA	20,3	15,9
Isovaleryl-CoA	10,2	8,2
Hexanoyl-CoA	10,3	-
Octanoyl-CoA	0	11,0

4.13.2 Enzymkinetik

Für die Substrate Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA wurden die K_m -, K_{cat} - und K_{cat}/K_m -Werte ermittelt.

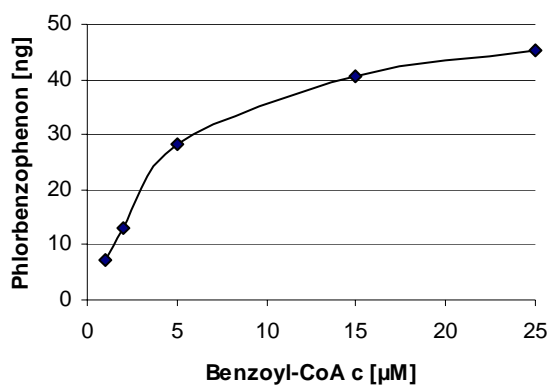


Abb. 4-41: Michaelis-Menten-Kinetik für Benzoyl-CoA (*H. calycinum*-BPS)

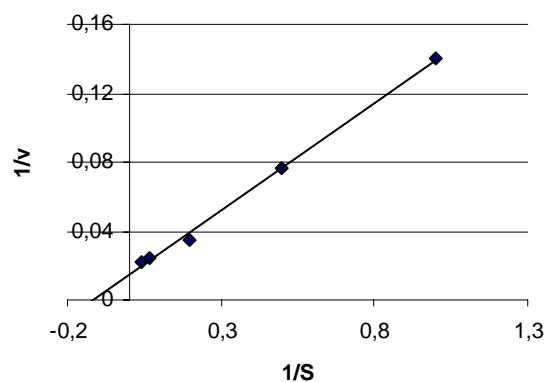


Abb. 4-42: Bestimmung des K_m -Werts für Benzoyl-CoA nach Lineweaver-Burk

Aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ergab sich für Benzoyl-CoA nach Lineweaver-Burk ein K_m von 8,4 μM und nach Hanes ein K_m -Wert von 6,3 μM (Abb. 4-42). Nach Eadie-Hofstee war der K_m -Wert 7,3 μM .

Der K_{cat} -Wert war 0,68 min^{-1} . Daraus errechnete sich der K_{cat}/K_m -Wert von 1343 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$.

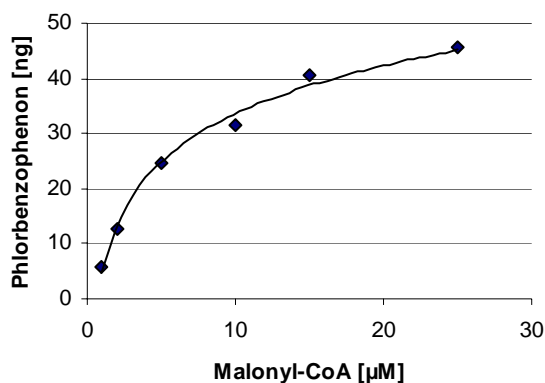


Abb. 4-43: Michaelis-Menten-Kinetik für Malonyl-CoA (*H. calycinum*-BPS)

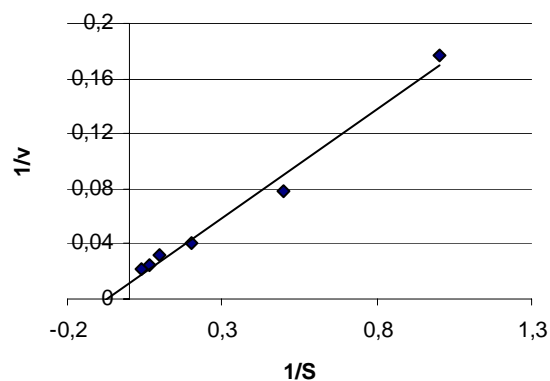


Abb. 4-44: Bestimmung des K_m -Werts für Malonyl-CoA nach Lineweaver-Burk

Für Malonyl-CoA ergab sich nach Lineweaver-Burk ein K_m -Wert von 13,3 μM , nach Hanes ein K_m -Wert von 8,5 μM und nach Eadie-Hofstee ein K_m -Wert von 9,1 μM (Abb. 4-44).

4.14 Zusammenfassung der kinetischen Daten

In Tabelle 4-8 sind die kinetischen Eigenschaften der drei aktiven rekombinanten PKS zusammengestellt.

Tab. 4-8: Kinetische Eigenschaften der drei rekombinanten PKS

	p-Cumaroyl-CoA			Benzoyl-CoA			Malonyl-CoA
	K_m [μM]	K_{cat} [min^{-1}]	K_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$]	K_m [μM]	K_{cat} [min^{-1}]	K_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$]	K_m [μM]
H.p. CHS	3,6	2,01	9300	-	-	-	9,1
H.c. CHS	4,0	1,57	6541	-	-	-	13,8
H.c. BPS	-	-	-	8,4	0,68	1343	13,3

5. Diskussion

An der antidepressiven Wirksamkeit von Extrakten des Johanniskrauts (*H. perforatum*) sind Hyperforine, Flavonoide und Hypericine beteiligt (Nahrstedt und Butterweck, 1997). Xanthone kommen nur in geringer Konzentration vor. Alle diese aktiven Verbindungen sind, zumindest teilweise, Derivate des Polyketid-Stoffwechsels. Eine quantitativ wie pharmakologisch herausragende Rolle spielt das Hyperforin, dessen Biosynthese in dieser Arbeit untersucht wurde. Hyperforin und Adhyperforin wurden in Zellkulturen von *H. calycinum* detektiert. Die Zellkulturen wurden charakterisiert und die Hyperforine identifiziert. Interessanterweise war die Hauptkomponente das Adhyperforin, während die Hyperforin-Konzentration etwa zehnmal geringer war. Das umgekehrte Verhältnis liegt in Blüten und Früchten von *H. perforatum* vor (Maisenbacher und Kovar, 1992). Hier kommt vornehmlich Hyperforin vor und macht bis zu 2 bzw. 4 % des Trockengewichts aus. Der Adhyperforin-Gehalt ist etwa nur ein Zehntel.

Verglichen mit den Konzentrationen in intakten Pflanzen war der Adhyperforin-Gehalt in *H. calycinum*-Zellkulturen mit 0,03 % des Trockengewichts relativ gering. Er konnte auch nicht durch Elicitierung gesteigert werden. Elicitoren sind z.B. Zellwandbestandteile von pathogenen Organismen, die die Bildung von Phytoalexinen stimulieren (Schröder, 1998). An Sprosskulturen von *H. perforatum* wurde kürzlich gezeigt, dass die Akkumulation von Secohyperforin durch Jasmonate zweifach und Mannan vierfach erhöht werden kann (A. Charchoglyan, persönliche Mitteilung). In *H. perforatum*-Kalluskulturen dagegen wurden vor und nach Elicitierung keine Hyperforine beobachtet.

In intakten Pflanzen von *H. calycinum* wurden ebenfalls bisher keine Hyperforine gefunden. Eine Anzahl von verwandten prenylierten Phloroglucinol-Derivaten ist aber bereits isoliert worden (Decosterd et al., 1991; Gronquist und Eisner, 2001). In Blüten von *H. calycinum* sind sie zusammen mit Flavonoiden an der Ausbildung von UV-reflektierenden und UV-absorbierenden Zonen beteiligt (Gronquist und Eisner, 2001). Darüber hinaus kommen sie in hoher Konzentration in der Wand des Fruchtknotens vor. Der Fruchtknoten-Inhalt ist dagegen nahezu frei von den Verbindungen. Dies weist darauf hin, dass die Phloroglucinol-Derivate sowohl Aufgaben der Anlockung als auch der Abwehr wahrnehmen.

Hyperforin gilt als relativ instabil (Maisenbacher und Kovar, 1992). Eine in *H. perforatum* detektierte oxidierte Form des Hyperforins, das Furohyperforin oder Orthofoforin, könnte ein Abbauprodukt oder auch ein genuiner Sekundärmetabolit sein (Verotta et al., 2000). Die Lagerung von Hyperforin unter Stickstoff als Schutzgas führt zu erhöhter Stabilität. In

Methanol (80 %) unter Lichtausschluss ist Hyperforin am stabilsten (Orth, 1999). Die von uns trocken oder in Methanol aufbewahrten Referenzsubstanzen und Hyperforin/Adhyperforin-haltigen Extrakte waren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ebenfalls über Wochen und Monate vergleichsweise stabil.

Die Biosynthese der Hyperforine kann in zwei Abschnitte gegliedert werden: erstens die Bildung des Grundgerüsts und nachfolgend die Prenylierungsreaktionen. Die Bildung des Grundgerüsts wurde in *H. calycinum*-Zellkulturen nachgewiesen. Sie wird von einer Typ III-PKS, der Isobutyrophenon-Synthase (BUS), katalysiert. Dieses Enzym kondensiert das aliphatische Startermolekül Isobutyryl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem intermediären Tetraketid, das zum Phlorisobutyrophenon zyklisiert wird (Abb. 5-1).

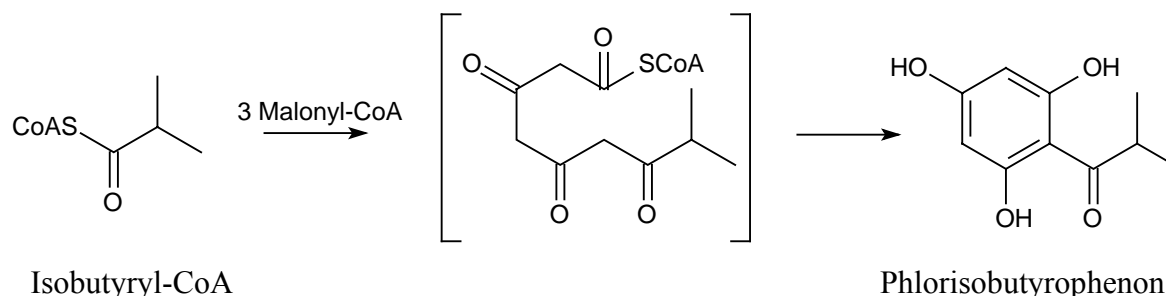


Abb. 5-1: Reaktion der Isobutyrophenon-Synthase

In Enzymsätsen, in denen Isobutyryl-CoA als Starter-Substrat durch Benzoyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA ersetzt wurde, kam es ebenfalls zur Bildung von enzymatischen Produkten: Phlorbenzophenon bzw. Naringenin. Dies war ein Hinweis darauf, dass neben BUS auch BPS und CHS, also drei Typ III-PKS, in *H. calycinum*-Zellkulturen vorkamen. Es bestand aber auch die Möglichkeit, dass nicht drei verschiedene Enzyme die beobachteten Reaktionen katalysierten, sondern eine PKS auch die anderen Substrate akzeptierte. Eine Trennung der drei PKS-Aktivitäten durch Anionenaustausch-Chromatographie lieferte schließlich den endgültigen Beweis für das Vorkommen von BUS, BPS und CHS in *H. calycinum*-Zellkulturen.

Typ III-PKS treten in Pflanzen und Bakterien auf. Sie katalysieren die Bildung einer ganzen Reihe von Naturstoffen durch Verknüpfung von Thioester-gebundenen Startermolekülen mit mehreren aus Malonyl-CoA stammenden Acetat-Einheiten zu linearen Polyketiden, die dann zyklisiert werden (Schröder, 1997). Dieser Reaktionstyp wurde erstmals von Birch und Donovan (1953) beschrieben. Der erste funktionell wie strukturell beschriebene und damit bekannteste Vertreter dieser Enzymfamilie ist die CHS.

Die spezifische Aktivität der BUS stieg in den *H. calycinum*-Zellkulturen direkt nach dem Überimpfen der Zellen in frisches Nährmedium an und erreichte ihr Maximum bereits am 2. Tag, d.h. vor dem der BPS und CHS (3. bzw. 4. Tag). Dieser schnelle Aktivitätsanstieg wurde als vorteilhaft für die Klonierungsarbeiten angesehen, dennoch waren die spezifischen Aktivitäten von CHS und BPS höher als die der BUS. Die PKS waren im Rohextrakt relativ instabil. Nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen verloren sie ihre Aktivität gänzlich. Ähnliches wurde für die Isovalerophenon-Synthase (VPS) aus *Humulus lupulus* beobachtet. Dieses Enzym war so instabil, dass die Reinigung ohne Unterbrechung innerhalb von 13-14 h erfolgen musste (Paniego et al., 1999).

Die VPS ist beteiligt an der Biosynthese der Bitterstoffe im Hopfen. Als Starter-Substrate für das Enzym dienen Isovaleryl-CoA und Isobutyryl-CoA (Paniego et al., 1999). Die von Fung et al. (1994) beschriebene und von Paniego et al. (1999) zur Homogenität gereinigte VPS ist ein Homodimer mit einer Untereinheiten-Molekülmasse von 43 kDa. Die VPS besaß keine CHS-Aktivität (Paniego et al., 1999). Kürzlich gelang es Okada und Ito (2001), aus einer cDNA-Bank nach Substraktion einen VPS-Klon zu isolieren. Wenig später wurde eine zweite VPS aus *Psilotum nudum* kloniert (Yamazaki et al., 2001).

Der Sequenzvergleich der beiden VPS mit CHS und BPS ergab eine Homologie auf Aminosäureebene von 48 bis 73 % (Tab. 5-1). Wenn die VPS aus *Humulus lupulus* und *Psilotum nudum* mit den beiden in diesen Spezies vorkommenden CHS verglichen wurden, ergaben sich Identitäten von 73,2 bzw. 58,6 %. Nur 54,3 bzw. 48,1 % Identität bestanden zur BPS aus *H. androsaemum*. Im Abgleich der PKS (Abb. 5-2) konnten die drei funktionell wichtigen Aminosäuren des aktiven Zentrums und mehrere Bereiche mit hochkonservierten Aminosäuren identifiziert werden.

Tab. 5-1: Prozentuale Identität von ausgewählten PKS auf Aminosäure-Ebene

Identität [%]	1	2	3	4	5
1 <i>H. androsaemum</i> -BPS		59,1	59,4	54,3	48,1
2 <i>H. androsaemum</i> -CHS			98,5	73,1	58,6
3 <i>H. perforatum</i> -CHS				73,2	59,4
4 <i>Humulus lupulus</i> -VPS					56,8
5 <i>Psilotum nudum</i> -VPS					

Abb. 5-2: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von fünf ausgewählten PKS (BPS und CHS aus *H. androsaemum*, CHS aus *H. perforatum*, VPS aus *Humulus lupulus* und *Psilotum nudum*)

Da die Übereinstimmung der VPS aus Hopfen mit anderen CHS-verwandten Enzymen bei 73 % lag und die Identität der BPS aus *H. androsaemum* mit der CHS aus derselben Spezies 60 % ausmachte, wurde davon ausgegangen, dass auch die gesuchte BUS mit anderen Typ III-PKS eine Homologie von 60 bis 80 % zeigen sollte.

Die Klonierung der BUS erwies sich jedoch als wesentlich schwieriger als angenommen. mRNA wurde aus 1 und 2 Tage alten *H. calycinum*-Zellkulturen isoliert. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die CHS noch nicht ihre maximale Aktivität. Ebenso wurde mRNA aus *H. perforatum*-Knospen und -Früchten isoliert, da in diesen Organen die höchste Hyperforinkonzentration detektiert wurde (Tekelova et al., 2000). Wenn aber in der isolierten poly(A⁺)-RNA eine mRNA-Spezies in hohem Überschuss vorliegt, wird diese bevorzugt amplifiziert, während geringer transkribierte Gene nicht detektiert werden. Folglich erwiesen sich viele Amplifikate nach dem Sequenzieren als Fragmente der CHS.

Schließlich konnten aber doch aus den Zellkulturen von *H. calycinum* zwei Fragmente mit 796 und 539 Basen erhalten werden, die möglicherweise für BUS kodieren. Auch aus *H. perforatum*-Knospen wurde ein Fragment amplifiziert, das zu 95 % mit der längeren Sequenz aus *H. calycinum* identisch war. Im Datenbankvergleich wies das erste Fragment 80 % Identität mit der CHS aus *Vitis vinifera* auf. Für das zweite Fragment ergaben sich Homologien von 48-62 % mit den bekannten CHS. Eine etwas niedrigere Homologie (40 %) wurde im Vergleich der Sequenz mit der VPS aus Hopfen festgestellt. Die drei erhaltenen Fragmente werden zur Zeit von einem anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe verschiedenen 5'-RACE-Methoden unterworfen, um dann die vollständigen Klone der funktionellen Analyse zuführen zu können.

Wie oben erwähnt, wird das Grundgerüst der Hyperforine mehrfach prenyliert; der postulierte Weg ist in Abb. 5-3 gezeigt. Wie viele Prenyltransferasen beteiligt sind, ist noch nicht geklärt. Die erste Prenylierungsreaktion wurde kürzlich in *H. calycinum*-Zellkulturen nachgewiesen (Boubakir et al., 2004). Das Enzym ist im Gegensatz zu den bekannten Prenyltransferasen löslich und seine Aktivität ist Fe²⁺-abhängig. Adam et al. (2002) haben gezeigt, dass die fünf Isoprenoid-Einheiten, die in die Hyperforine eingebaut werden, über den Desoxyxylulose-Phosphat-Weg entstehen.

Im Hopfen werden die als Grundgerüste vorkommenden Phloroglucinol-Derivate nur zweimal prenyliert. Die Prenyltransferasen liefern Desoxyhumulon und Desoxycohumulon, die dann weiter zu den α -Säuren Humulon und Cohumulon und nach nochmaliger Prenylierung zu den β -Säuren Lupulon und Colupulon umgesetzt werden. Die Prenyltransferase-Aktivität des Hopfens wurde bereits charakterisiert, auch sie stellt eine

lösliche Enzymaktivität dar (Zuurbier et al., 1998). In diesem Fall ist ebenfalls noch offen, ob es sich um ein oder mehrere Enzyme handelt.

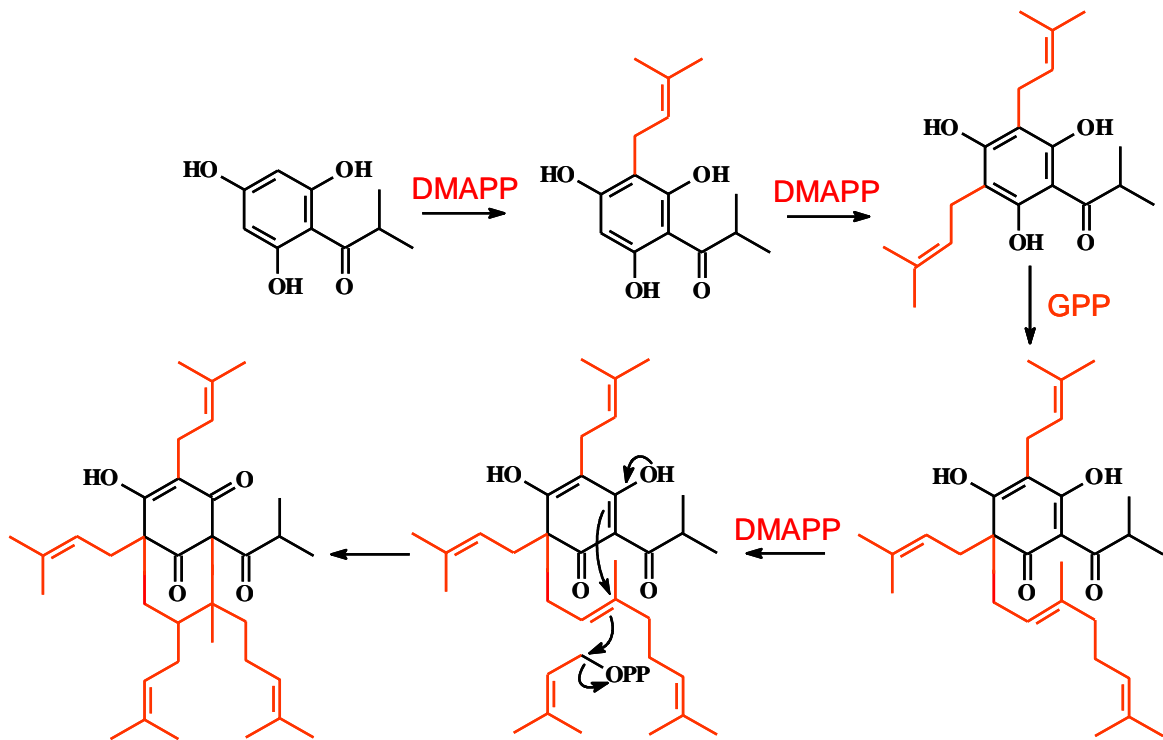


Abb. 5-3: Prenylierungsschritte in der Hyperforin-Biosynthese

Eine PKS, die hier erfolgreich kloniert wurde, ist die Benzophenon-Synthase (BPS). Sie katalysiert einen zentralen Schritt in der Xanthon-Biosynthese, die Bildung des C₁₃-Grundgerüsts in Form eines intermediären Benzophenons. Dabei reagiert ein Molekül Benzoyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem Tetraketid, welches zum 2,4,6-Trihydroxybenzophenon zyklisiert wird (Abb. 5-4; Schmidt und Beerhues, 1997). Dieser Metabolit wird durch die Benzophenon-3'-Hydroxylase zum 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon und anschließend durch die Xanthon-Synthase, ein Cytochrom P450-Enzym, zum 1,3,7-Trihydroxyxanthon umgesetzt. Ähnlich verläuft die Xanthon-Biosynthese in Zellkulturen von *Centaurium erythraea*. Hier wird 3-Hydroxybenzoyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA direkt zum 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon kondensiert, welches dann im Gegensatz zum obigen 1,3,7-Trihydroxyxanthon über eine Etherbrücke zum isomeren 1,3,5-Trihydroxyxanthon zyklisiert wird (Beerhues, 1996).

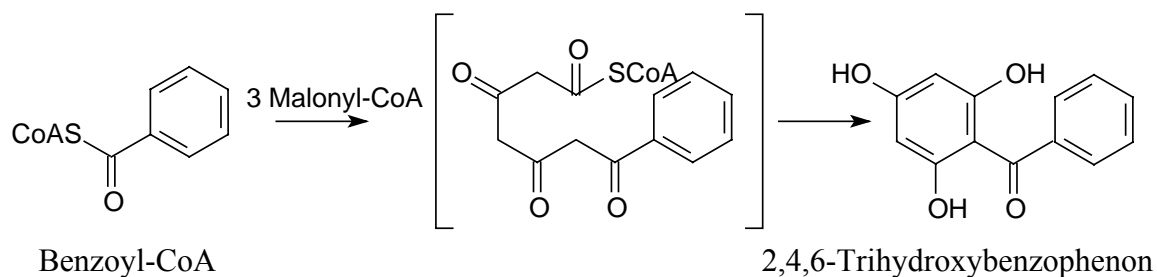


Abb. 5-4: Reaktion der Benzophenon-Synthase im Johanniskraut

Neben der intramolekularen Zyklisierung zu Xanthonen können einfache Benzophenone auch eine Polyprenylierung erfahren. Durch zusätzliche Zyklisierungsreaktionen resultieren komplexe Benzophenon-Derivate mit käfigartigem Gerüst (Abb. 5-5). Diese besitzen zum Teil interessante pharmakologische Eigenschaften. Beispielsweise ist Guttiferon F antimikrobiell und anti-HIV wirksam (Cuesta Rubio et al., 1999; Fuller et al., 1999). Sampsonion A zeigt zytotoxische Aktivität. Das gilt auch für das Xanthon Psorospermin, während Rubraxanthon eine ausgesprochene antibakterielle Aktivität aufweist. Einige Xanthone hemmen die Monoamin-Oxidase A (MAO A) (Thull und Testa, 1994). Drei aus *H. brasiliense* isolierte Xanthone wiesen eine unterschiedlich starke Inhibition von MAO A und MAO B auf (Rocha et al., 1994).

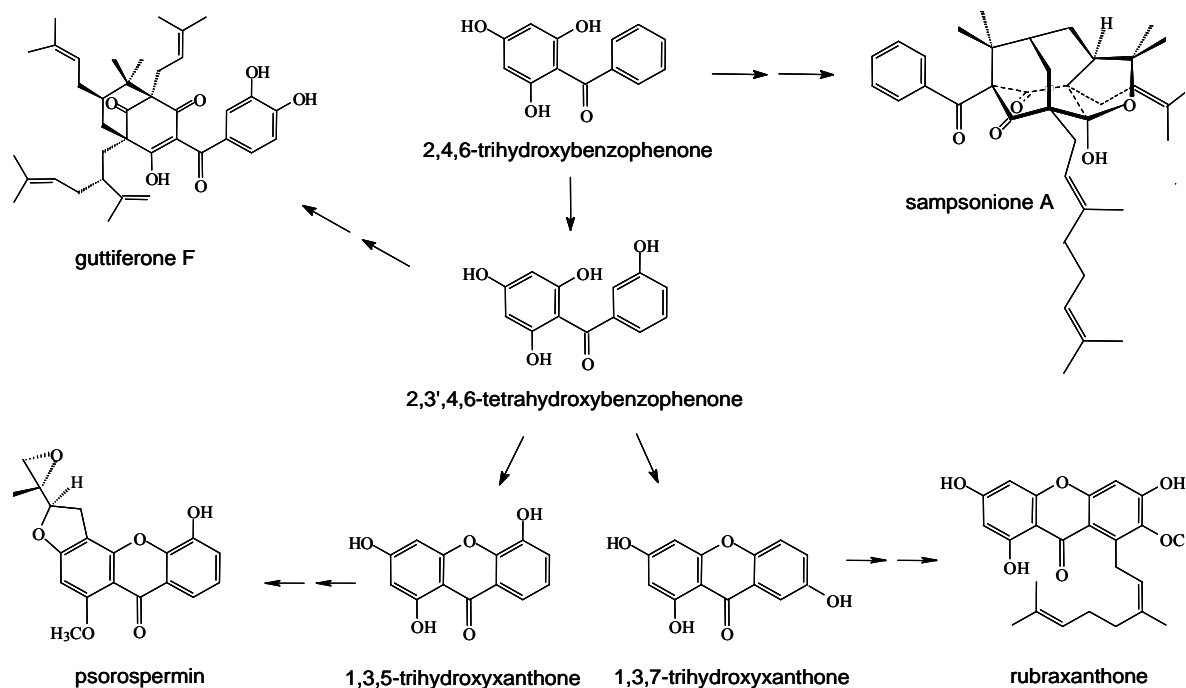


Abb. 5-5: Überblick des Benzophenon-Stoffwechsels

Die erste BPS-cDNA wurde aus *H. androsaemum*-Zellkulturen kloniert, heterolog exprimiert und charakterisiert (Liu et al., 2003). Verglichen mit den aus *H. perforatum*-Knospen und *H. calycinum*-Zellkulturen klonierten BPS ergaben sich nur in wenigen Aminosäuren Unterschiede zwischen diesen drei BPS. Die Identität lag zwischen 94 und 98 %. Die Homologie zu anderen Vertretern der Typ III-PKS-Familie war niedriger (53-63 %). Der kodierende Bereich der BPS-mRNA aus *H. calycinum* umfasste 1188 Basen, entsprechend 395 Aminosäuren und 42,7 kDa. Die gleichen Ergebnisse wurden für die BPS aus *H. androsaemum* beschrieben (Liu et al., 2003). Dagegen überraschte die Verkürzung um 4 Aminosäuren im N-terminalen Bereich der BPS aus *H. perforatum*. Die Aminosäuren 10 bis 13 fehlten, dann folgte statt eines Glycins ein Glutamin. Die Gesamtlänge des ORF betrug daher nur 1176 Basen, entsprechend 391 Aminosäuren und 42,3 kDa. Möglicherweise lässt sich hiermit die Inaktivität der rekombinanten *H. perforatum*-BPS erklären, was zukünftig durch ortsgerichtete Mutagenese überprüft werden kann.

Das in den meisten PKS III konservierte Ser 338, welches über die Länge des gebildeten Polyketids mitentscheidet (Ferrer et al., 1999; Jez et al., 2000), ist in allen drei BPS durch ein Glycin ersetzt. In der 2-Pyron-Synthase (2PS) befindet sich an dieser Stelle ein Isoleucin. Durch eine Tripelmutation (T197L, G256L, S338I) konnte die CHS in 2PS überführt werden (Jez et al., 2000). Auch eine weitere Aminosäure, Phe 265, die für die Substratspezifität Bedeutung hat, ist in den BPS durch Tyrosin ersetzt. Hingegen waren die drei hochkonservierten katalytischen Aminosäuren Cys 164, His 303 und Asn 336 wie in allen anderen Typ III-PKS zu finden.

Die rekombinante *H. calycinum*-BPS bevorzugte Benzoyl-CoA als Startermolekül. 3-Hydroxybenzoyl-CoA diente nicht als Substrat, während die BPS aus *H. androsaemum* mit diesem CoA-Ester eine Aktivität von 18,8 % des Maximums erreichte (Liu et al., 2003).

Die optimalen Reaktionsbedingungen (30 °C, pH 7 und 10 µM DTT) waren mit den publizierten Daten für die *H. androsaemum*-BPS und andere PKS vergleichbar. So ähnlich die Temperatur- und pH-Optima waren, so unterschiedlich waren die kinetischen Daten der beiden BPS. Für *H. calycinum*-BPS betrug der K_m -Wert für Benzoyl-CoA 8,4 µM und für Malonyl-CoA 13,3 µM. Der K_{cat} -Wert war 0,68 min⁻¹, woraus sich ein K_{cat}/K_m -Wert von 1343 M⁻¹sec⁻¹ errechnete. Die publizierten K_{cat} und K_{cat}/K_m -Werte für die *H. androsaemum*-BPS waren deutlich höher (K_{cat} 9,66 min⁻¹; K_{cat}/K_m 28345 M⁻¹sec⁻¹). Für andere verwandte PKS sind in der Literatur ebenfalls niedrigere Werte angegeben (Jez et al., 2000, 2002).

Die dritte PKS, die aus beiden *Hypericum*-Spezies kloniert wurde, ist die Chalkon-Synthase (CHS). Sie ist der bekannteste Vertreter der Typ III-PKS und fungiert als Schlüsselenzym der

Flavonoid-Biosynthese. Dieser Weg startet mit Bausteinen des Phenylpropan-Stoffwechsels (Abb. 5-6). Das über den Shikimisäureweg entstehende Phenylalanin wird durch die Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL) in Zimtsäure überführt, die dann durch die Zimtsäure-4-Hydroxylase in p-Cumarsäure und weiter mit Hilfe der 4-Cumarat:CoA-Ligase in den CoA-Ester umgesetzt wird. Die anschließende Kondensation mit drei Molekülen Malonyl-CoA wird durch die CHS katalysiert. Das entstandene Chalkon zyklisiert zum Naringenin, entweder stereospezifisch durch die Chalkon-Flavanon-Isomerase oder nicht stereospezifisch in wässriger alkalischer Lösung. Das Flavonoid-Grundgerüst kann weiter modifiziert werden. In der Natur kommen über 6000 Flavonoide vor (Austin und Noel, 2003).

Im Johanniskraut wurden Flavonole, Flavonolglykoside und Biflavone detektiert (Erdelmeier, 1998). Dazu gehören z.B. Quercetin, Quercitrin, Isoquercitrin, Rutin und Hyperosid. Sie haben Anteil an der antidepressiven Wirksamkeit von Johanniskrautextrakten, wobei der Zuckeranteil wohl wegen der unterschiedlichen Bioverfügbarkeit von Bedeutung ist. So sind im mit Ratten durchgeführten Schwimm-Test nach Porsolt das Quercetin-3-O-Glukosid (Isoquercitrin), das 3-O-Galaktosid (Hyperosid) und das 3-O-Glucuronid (Miquelianin) aktiv (Butterweck et al., 2000; Müller und Gastpar, 2001). Das Rhamnosid (Quercitrin) und das Rutinosid (Rutin) waren inaktiv. Nöldner (2002) beobachtete, dass Rutin zwar als Einzelsubstanz unwirksam ist, aber im Extrakt in ausreichender Menge vorhanden sein muss.

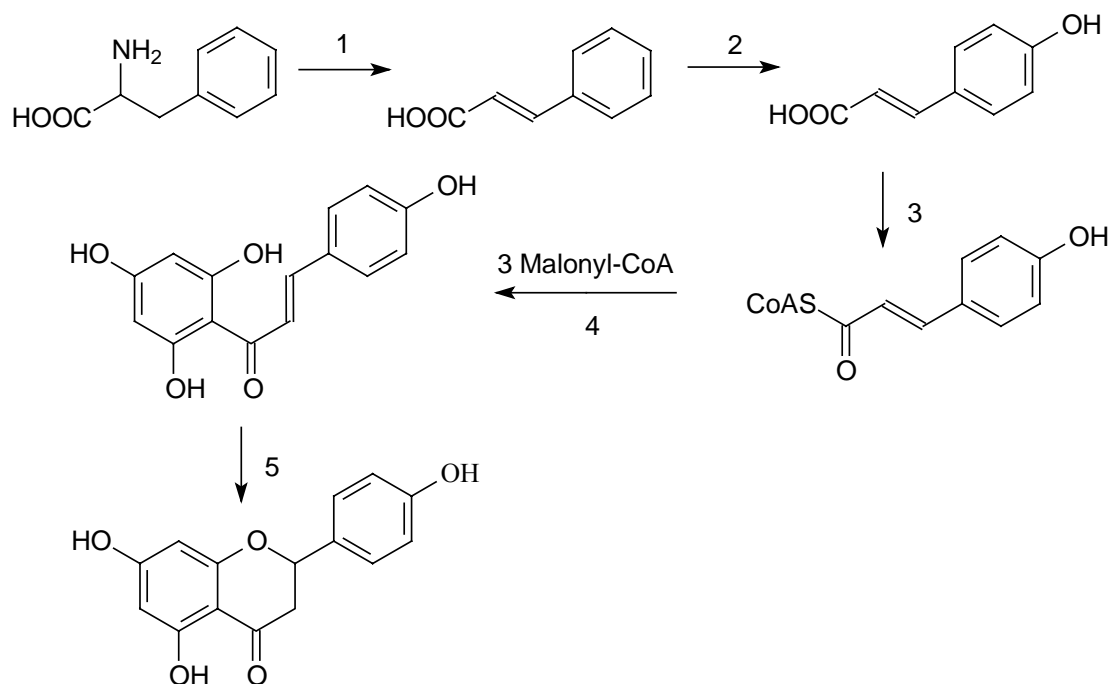


Abb. 5-6: Biosynthese der Flavonoide

1 PAL, 2 Zimtsäure-4-Hydroxylase, 3 4-Cumarat:CoA-Ligase,
4 **Chalkon-Synthase**, 5 Chalkon-Flavanon-Isomerase

Die Bildung von Naringenin aus Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA ist schon vor langer Zeit unter Verwendung radioaktiv markierter Substrate nachgewiesen worden (Kreuzaler und Hahlbrock, 1972). Seitdem wurde das Enzym in einer Vielzahl von Pflanzen detektiert. 1983 wurde erstmals von der Isolation eines CHS-Gens berichtet (Reimold et al., 1983). Im Jahr 2002 enthielt die Genbank schon etwa 650 CHS-verwandte Nukleotid-Sequenzen, wobei allerdings nur für einen geringen Anteil die Funktion wirklich gezeigt wurde (Austin und Noel, 2003). In den meisten Fällen wurde lediglich aufgrund der Sequenzähnlichkeit auf CHS geschlossen.

Die CHS aus *Medicago sativa* wurde kürzlich als erste Typ III-PKS kristallisiert und in ihrer dreidimensionalen Struktur aufgeklärt (Ferrer et al., 1999). Das Enzym ist ein Homodimer von 84 kDa, das über zwei unabhängige aktive Zentren verfügt. Jedes katalytische Zentrum besteht aus einem CoA-Bindetunnel, einer Startersubstrat-Binderegion und einer Zyklisierungstasche.

Die meisten Pflanzen besitzen mehrere Kopien von CHS-Genen, die in verschiedenen Geweben und in verschiedenen Entwicklungsstadien exprimiert werden. Manche der Isoenzyme werden konstitutiv exprimiert, bei anderen wird die Transkription durch UV-Strahlung, Verletzung oder Pathogene induziert (Austin und Noel, 2003). Auch die BPS in *H. androsaemum* wird von einer Genfamilie aus 5-6 Mitgliedern kodiert (B. Liu, persönliche Mitteilung).

Die CHS sowohl aus *H. calycinum*-Zellkulturen als auch *H. perforatum*-Knospen wurde kloniert, exprimiert und charakterisiert. Die beiden Sequenzen hatten eine Homologie von 98,7 % (Tab. 5-2). Zu den BPS gab es Identitäten auf Aminosäureebene von etwa 57 %. Die CHS und BPS aus *H. androsaemum* waren zu 60,1 % identisch (Liu et al., 2003). Der ORF der CHS-cDNA aus *H. perforatum* hatte eine Länge von 1170 Basenpaaren, die für 389 Aminosäuren und ein 42,7 kDa großes Protein kodierten. Der ORF der CHS-cDNA aus *H. calycinum* war 1173 Basen lang, das entspricht 390 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 42,8 kDa. Die bereits klonierte CHS aus *H. androsaemum* ist 1173 Basen lang, das kodierte Protein besteht aus 390 Aminosäuren, das Molekulargewicht beträgt 42,7 kDa (Liu et al., 2003). Die in den CHS-verwandten Enzymen hochkonservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums Cys 164, His 303 und Asn 336 waren auch in den beiden neu klonierten *Hypericum*-Sequenzen zu finden.

Tab. 5-2: Prozentuale Identität der vier rekombinanten PKS auf Aminosäure-Ebene

Identität [%]	1	2	3	4
1 <i>H. perforatum</i> -CHS		98,7	56,9	57,7
2 <i>H. calycinum</i> -CHS			57,0	57,8
3 <i>H. perforatum</i> -BPS				94,6
4 <i>H. calycinum</i> -BPS				

Typ III-PKS sind schon mehrfach erfolgreich in einem prokaryontischen System exprimiert worden (Junghanns et al., 1995; Suh et al., 2000; Okada und Ito, 2001 und Liu et al., 2003). In dieser Arbeit wurde die anschließende biochemische Charakterisierung der CHS und BPS für die gereinigten Fusionsproteine mit dem Glutathion-S-Transferase-Anteil durchgeführt. Bereits früher war für die überexprimierten BPS und CHS aus *H. androsaemum* festgestellt worden, dass der Fusionsanteil nicht die Spezifität der Enzyme verändert, aber deren Stabilität erhöht (Liu et al. 2003). Die CHS aus *Pueraria lobata* und die STS aus *Arachis hypogaea* wurden als Thioredoxin-Fusionsproteine exprimiert. Auch hier waren die spezifischen Aktivitäten und die Produkt-Profile mit und ohne den Fusionsanteil identisch (Suh et al., 2000).

Beide klonierten CHS präferierten p-Cumaroyl-CoA als Startersubstrat. Die CHS akzeptiert in der Regel eine Reihe von Startersubstraten und oft werden neben dem Naringenin lineare Produkte oder Laktone gebildet (Yamaguchi et al., 1999; Austin und Noel, 2003). Als Nebenprodukte der von *H. androsaemum*-CHS katalysierten Umsetzung des p-Cumaroyl-CoA wurden *in vitro* Bis-Noryangonin und 4-Cumaroyl-Triacetat-Lakton detektiert (Yamaguchi et al., 1999; Liu et al., 2003). Die *H. perforatum*- und *H. calycinum*-CHS akzeptierten neben p-Cumaroyl-CoA auch Cinnamoyl-CoA, Benzoyl-CoA, Butyryl-CoA, Isobutyryl-CoA und Isovaleryl-CoA. Das Temperatur-Optimum für das bevorzugte Substrat 4-Cumaroyl-CoA lag für beide CHS bei 35 °C. Der optimale pH-Wert für *H. perforatum*-CHS war 8, für die *H. calycinum*-CHS 7,5 und die höchste Aktivität wurde unter Zusatz von 50 µM DTT erreicht. Aus der Literatur sind ähnliche Werte bekannt, so hat die *Petroselinum*-CHS ein Temperatur-Optimum von 30 °C und ein pH-Optimum von 8 (Kreuzaler und Hahlbrock, 1975). Die optimalen Reaktionsbedingungen der kürzlich charakterisierten CHS aus *H. androsaemum* waren pH 7, 35 °C und 10 µM DTT (Liu et al., 2003).

Die hier ermittelten K_{cat} -Werte waren $2,01 \text{ min}^{-1}$ (*H. perforatum*-CHS) und $1,57 \text{ min}^{-1}$ (*H. calycinum*-CHS). Der K_{cat}/K_m -Wert lag bei $9300 \text{ M}^{-1}\text{Sec}^{-1}$ bzw. $6541 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$. Diese Werte

korellierten mit den in der Literatur dokumentierten Daten. Dort sind K_m -Werte für p-Cumaroyl-CoA von 4,9 bis 50 μM und für Malonyl-CoA von 3,0 bis 10,8 μM genannt (Suh et al., 2000; Liu et al., 2003). Die Literaturdaten bezüglich K_{cat} sind 2,56 und K_{cat}/K_m 8637 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$.

Wenn in Zukunft die vollständige Sequenz der BUS-cDNA vorliegt, sollen für die drei funktionell verschiedenen PKS genspezifische Sonden abgeleitet werden. Ferner werden möglichst heterologe Peptide der drei Enzyme für die Gewinnung BUS-, BPS- bzw. CHS-spezifischer Antikörper eingesetzt. Mit Hilfe dieser Antikörper und Sonden sollte es erstmals möglich sein, die differentielle Regulation und Lokalisation der drei PKS im Johanniskraut zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

- ▶ Zubereitungen aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) werden zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen eingesetzt. Ihre Wirksamkeit und gute Verträglichkeit wurden in zahlreichen klinischen Studien belegt. Die Wirkung beruht auf dem Zusammenspiel mehrerer Inhaltsstoffe. Maßgeblich beteiligt ist ein Phloroglucin-Derivat, das Hyperforin.
- ▶ Hyperforin und Adhyperforin wurden in *H. calycinum*-Zellkulturen, die in BDS-Medium im Dunkeln kultiviert wurden, detektiert. Ihre Identifizierung erfolgte durch Co-Chromatographie mit authentischen Referenzsubstanzen sowie HPLC-MS.
- ▶ Die Hauptkomponente war Adhyperforin. Der Adhyperforin-Gehalt stieg während der linearen Wachstumsphase der Zellkulturen an und erreichte das Maximum am 6.-8. Tag mit 0,03 % des Trockengewichts.
- ▶ In den Zellkulturen wurden drei Polyketid-Synthase-Aktivitäten detektiert. Die Inkubationen von zellfreien Extrakten mit den Starter-Substraten Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA in Gegenwart des Kettenverlängerers Malonyl-CoA führten zur Bildung von Phlorisobutyrophenon, Phlorbenzophenon bzw. Naringenin. Phlorisobutyrophenon wurde für die Identifizierung als Referenzsubstanz synthetisiert.
- ▶ Mittels Anionenaustausch-Chromatographie wurden die drei PKS-Aktivitäten getrennt. Damit war der Nachweis eigenständiger Enzyme geführt. Die Chalkon-Synthase bildet das Grundgerüst der Flavonoide, die Benzophenon-Synthase das der Benzophenone/Xanthone und die Isobutyrophenon-Synthase das der Hyperforine. Die drei Enzyme zeigten unterschiedliche Veränderungen ihrer spezifischen Aktivität während des Zellkulturwachstums.
- ▶ Aus zwei Tage alten Zellkulturen von *H. calycinum* sowie aus jungen Knospen und Früchten von *H. perforatum* wurde poly(A⁺)-RNA isoliert und anschließend cDNA für PCR- und RACE-Techniken synthetisiert.
- ▶ Mit Hilfe degenerierter Primer, die von konservierten Regionen von Typ III-PKS abgeleitet waren, wurden die cDNAs für Chalkon-Synthase aus *H. perforatum* und *H. calycinum* isoliert. Die Enzyme wurden in *E. coli* überexprimiert und charakterisiert. Der ORF der *H. perforatum*-CHS umfasste 1170 Basenpaare, das entspricht 389 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 42,7 kDa. Der kodierende Bereich der *H. calycinum*-CHS war 1173 Basen lang, das entspricht 390 Aminosäuren und 42,8 kDa. Die K_{cat}/K_m -Werte lagen bei 9300 M⁻¹sec⁻¹ (H.p.CHS) und 6541 M⁻¹sec⁻¹ (H.c.CHS). Das bevorzugte Starter-Substrat für

beide CHS war p-Cumaroyl-CoA, weiter wurden Cinnamoyl-CoA, Benzoyl-CoA, Butyryl-CoA, Isobutyryl-CoA und Isovaleryl-CoA umgesetzt.

► Ferner wurde aus beiden *Hypericum*-Spezies die Benzophenon-Synthase-cDNA kloniert. Auch diese Proteine wurden in *E. coli* überexprimiert. Die Länge des ORF der *H. perforatum*-BPS betrug 1176 Basenpaare, die für ein 42,3 kDa-Protein mit 391 Aminosäuren kodieren. Dieses Enzym war leider inaktiv. Hingegen war die rekombinante *H. calycinum*-BPS aktiv und wurde charakterisiert. Der ORF hatte eine Länge von 1188 Basen, das entspricht 395 Aminosäuren mit 42,7 kDa. Der K_{cat}/K_m -Wert lag bei $1343 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$. Das bevorzugte Starter-Substrat war Benzoyl-CoA, weiter wurden Butyryl-CoA, Isobutyryl-CoA, Isovaleryl-CoA, Hexanoyl-CoA und minimal auch p-Cumaroyl-CoA umgesetzt.

► Schließlich wurden für *H. calycinum* zwei cDNA-Fragmente und für *H. perforatum* ein cDNA-Fragment gewonnen, die 48-80 % Identität mit Typ III-PKS in der Datenbank aufwiesen. Sie kodieren möglicherweise für Isobutyrophenon-Synthase. Die Isolierung der vollständigen Klone war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

7. Literaturverzeichnis

- Abd El-Mawla, A. M. A., Schmidt, W., Beerhues, L. (2001) Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN. *Planta* 212: 288-293
- Abd El-Mawla, A. M. A., Beehues, L. (2002) Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta* 214: 727-733
- Abou-Shoer, M., Boettner, F. E., Chang, C.-J., Cassady, J. M. (1988) Antitumour and cytotoxic xanthenes of *Psorospermum febrifugum*. *Phytochemistry* 27 (9): 2795-2800
- Adam, P., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002) Biosynthesis of Hyperforin in *Hypericum perforatum*. *J. Med. Chem.* 45: 4786-4793
- Austin, M. B., Noel, J. P. (2003) The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* 20: 79-110
- Barillas, W., Beerhues, L. (1997) 3-Hydroxybenzoate:coenzyme A ligase and 4-coumarate:coenzyme A ligase from cultured cells of *Centaurium erythraea*. *Planta* 202: 112-116
- Beerhues, L., Berger, U. (1994) Xanthenes in cell suspension cultures of two *Centaurium* species. *Phytochemistry* 35 (5): 1227-1231
- Beerhues, L. (1996) Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaurium erythraea*. *FEBS Letters* 383: 264-266
- Betram, S., Gassen, H. G. (1991) Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanweisungen für das molekularbiologische Arbeiten. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523
- Boubakir, Z., Beuerle, T., Liu, B., Beerhues, L. The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. *Phytochemistry*, in Druck
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 245-248
- Butterweck, V., Nahrstedt, A. (2003) Was ist bekannt über Johanniskraut?; Phytochemie und Pharmakologie. *Pharm. Unserer Zeit* 3: 212-219
- Calapai, G., Crupi, A., Firenzuoli, F., Inferrera, G., Squadrito, F., Parisi, A., De Sarro, G., Caputi, A. (2001) Serotonin, Norepinephrine and Dopamine Involvement in the Antidepressant Action of *Hypericum perforatum*. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl. 1): 45-49

- Cervo, L., Rozio, M., Ekalle-Soppo, C. B., Guiso, G., Morazzoni, P., Caccia, S. (2002) Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of *Hypericum perforatum* extracts. *Psychopharmacology* 164: 423-428
- Chatterjee, S. S., Bhattacharya, S. K., Wonnemann, M., Singer, A., Müller, W. E. (1998) Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci.* 63 (6): 499-510
- Chatterjee, S. S., Biber, A., Weibezahn, C. (2001) Stimulation of Glutamate, Aspartate and Gamma-Aminobutyric Acid Release from Synaptosomes by Hyperforin. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl. 1): 11-19
- Creelmann, R. A., Mullet, J. E. (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4114-4119
- Czygan, F. C. (2003) Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrauts. *Pharm. Unserer Zeit* 3: 184-190
- Decosterd, L. A., Stoeckli-Evans, H., Chapuis, J.-C., Msonthi, J. D., Sordat, B., Hostettmann, K. (1989) 55. New Hyperforin Derivatives from *Hypericum revolutum* VAHL with Growth-Inhibitory Activity against a Human Colon Carcinoma Cell Line. *Helvetica Chimica Acta* 72: 464-471
- Decosterd, L. A., Hoffmann, E., Kyburz, R., Bray, D., Hostettmann, K. (1991) A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity. *Planta Med.* 57 (6): 548-551
- Dewick, P. M. (1994) The Biosynthesis of Shikimate Metabolites. *Nat. Prod. Rep.*: 173-203
- Diefenbach, C. W., Dveksler, C. S. (1995) PCR Primer, A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085-1097
- Dunstan, D. I., Short, K. C. (1977) Improved Growth of Tissue Cultures of the Onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 41: 70-72
- Eckermann, S., Schröder, G., Schmidt, J., Strack, D., Edrada, R. A., Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Kilpeläinen, I., Proksch, P., Teeri, T. H., Schröder, J. (1988) New pathway to polyketides in plants. *Nature* 336: 387-390
- Eckert, G. P., Müller, W. E. (2001) Effects of Hyperforin on the Fluidity of brain Membranes. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl. 1): 22-25
- Erdelmeier, C. A. J. (1998) Hyperforin, Possibly the Major Non-Nitrogenous Secondary Metabolite of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl.): 2-6

- Ferrer, J.-L., Jez, J. M., Bowmann, M. E., Dixon, R. A., Noel, J. P. (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature structural biology* 6 (8): 775-784
- Friede, M., Wüstenberg, P. (1998) Johanniskraut zur Therapie von Angstsyndromen bei depressiven Verstimmungen. *Zeitschrift für Phytotherapie* 19: 309-317
- Frohmann, M. A., Dush, M. K., Martin, G. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8997-9002
- Fung, S.-Y., Brussee, J., van der Hoeven, R. A. M., Niessen, W. M. A., Scheffer, J. J. C., Verpoorte, R. (1994) Analysis of proposed aromatic precursors of hop bitter acids. *J. of Natural Products* 57 (4): 452-459
- Gaedecke, F. (2003) Beispiel: Johanniskraut; Herstell- und Qualitätsaspekte pflanzlicher Extrakte. *Pharm. Unserer Zeit* 3: 192-201
- Gastpar, M. T. (1998) Antidepressiva. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart
- Görlach, J., Schmidt, J. (1996) Introducing *StuI* sites improves vectors for the expression of fusion proteins with factor Xa cleavage sites. *Gene* 170: 145-146
- Gronquist, M., Bezzerides, A., Attygale, A., Meinwald, J., Eisner, M., Eisner, T. (2001) Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (24): 13745-13750
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., Zenk, M. H. (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2389-2393
- Herrmann, K. M. (1995) The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism. *Plant. Physiol.* 107: 7-12
- Holton, T. A., Graham, M. W. (1990) A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using dTT-tailed vectors. *Nucl. Acids Research* 19: 1156
- Hölzl, J., Ostrowski, E. (1987) Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). *Deutsche Apotheker Zeitung* 23: 1227-1230
- Hölzl, J., Schütt, H. (1994) Johanniskraut: eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva? *Pharmaz. Zeitung* 46: 3959-3977
- Hu, L.-H., Khoo, C.-W., Vittal, J. J., Sim, K.-Y. (2000) Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry* 53: 705-709
- Ignatuschenko, M. V., Winter, R. W., Bächinger, H. P., Hinrichs, D. J., Riscoe, M. K. (1997) Xanthenes as antimalarial agents; studies of a possible mode of action. *FEBS Letters* 409: 67-73

- Jensen, A. G., Hansen, S. H., Nielsen, E. O. (2001) Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. *Life Sci.* 68 (14): 1593-1605
- Jensen, A. G., Hansen, S. H. (2002) Separation of hypericins and hyperforins in extract of *Hypericum perforatum* L. using non-aqueous capillary electrophoresis with reversed electro-osmotic flow. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (1-2): 167-176
- Jez, J. M., Ferrer, J.-L., Bowmann, M. E., Dixon, R. A., Noel, J. P. (2000) Dissection of Malonyl-Coenzyme A Decarboxylation from Polyketide Formation in the Reaction Mechanism of a Plant Polyketide Synthase. *Biochemistry* 39: 890-902
- Jez, J. P., Noel, J. P. (2000) Mechanism of Chalcone Synthase. *J. Biol. Chem.* 275 (50): 39640-39646
- Jez, J. M., Austin, M. B., Ferrer, J.-L., Bowmann, M. E., Schröder, J., Noel, J. P. (2000) Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chemistry & Biology* 7: 919-930
- Jez, J. M., Bowmann, M. E., Noel, J. P. (2002) Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (8): 5319-5324
- Johne, A., Roots, I. (2003) Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und –interaktionen; Woran sollte man denken bei der Gabe von Johanniskraut-präparaten? *Pharm. Unserer Zeit* 3: 242-246
- Junghanns, K. T., Kneusel, R. E., Baumert A., Maier, W., Gröger, D., Matern, U. (1995) Molecular cloning and heterologous expression of acridone synthase from elicited *Ruta graveolens* L. cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology* 27: 681-692
- Kaul, R. (2000) Johanniskraut. *Wiss. Verlagsges., München*
- Kaul, R. (2000) Johanniskraut. *Deutsche Apotheker Zeitung* 7: 689-701
- van Klink, J. W., Brophy, J. J., Perry, N. B., Weavers, R. T. (1999) Triketones from Myrtaceae: Isoleptospermone from *Leptospermum scoparium* and Papuanone from *Corymbia dallachiana*. *J. Nat. Prod.* 62: 487-489
- Kodan, A., Kuroda, H., Sakai, F. (2002) A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (5): 3335-3339
- Kosasi, S., van der Sluis, W. G., Labadie, R. P. (1989) Multifidol and multifidol glucoside from the latex of *Jatropha multifida*. *Phytochemistry* 28 (9): 2439-2441
- Kreis, W., (1993) Arzneistoffe aus pflanzlichen Zell- und Gewebekulturen; Möglichkeiten und Grenzen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 15: 1333-1356

- Li, W., Fitzloff, J. F. (2001) High performance liquid chromatographic analysis of St. John's wort with photodiode array detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 765 (1): 99-105
- Liswidowati, F. M., Hohmann, F., Schwer, B., Kindl, H. (1991) Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinera* in cultured grapevine cells. *Planta* 183: 307-314
- Liu, B., Falkenstein-Paul, H., Schmidt, W., Beerhues, L. (2003) Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *The Plant Journal* 34: 847-855
- Liu, B., Beuerle, T., Klundt, T., Beerhues, L. (2004) Biphenyl synthase from yeast-extract-treated cell cultures of *Sorbus aucuparia*. *Planta* 218: 492-496
- Lukacin, R., Springob, K., Urbanke, C., Ernwein, C., Schröder, J., Matern, U. (1999) Native acridone synthases I and II from *Ruta graveolens* L. form homodimers. *FEBS Letters* 448 (1): 135-140
- Maisenbacher, P., Kovar, K.-A. (1992) Adhyperforin: A Homologue of Hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* 58: 291-293
- Melzer, M., Fuhrken, D. (1998) Hyperforin im Johanniskraut. *Deutsche Apotheker Zeitung* 49: 4754-4760
- Moore, L. B., Goodwin, B., Jones, S. A., Wisely, G. B., Serabjit-Singh, C., Willson, T. M., Collins, J. L., Klierer, S. A. (2000) St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (13): 7500-7502
- Morita, H., Noguchi, H., Schröder, J., Abe, I. (2001) Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase. *Eur. J. Biochem.* 268: 3759-3766
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- Müller, W. E., Singer, A., Wonnemann, M. (1999) Johanniskraut. *Deutsche Apotheker Zeitung* 17: 49-58
- Müller, W. E., Gastpar, M. (2001) Behandlung von depressiven Patienten in der täglichen Praxis; Stellenwert von Johanniskrautextrakt. *LinguaMed Verlags-GmbH*
- Müller, W. E., Holoubek, G. (2003) Die Pharmakologie von Johanniskrautextrakt; Plausibilität für eine therapeutische Anwendung als Antidepressivum? *Pharm. Unserer Zeit* 3: 220-226
- Nahrstedt, A., Butterweck, V. (1997) Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 30 (Suppl. 2): 129-134

- Nöldner, M., Chatterjee, S. (2001) Effects of two different extracts of St. John's wort and some of their constituents on cytochrome P450 activities in rat liver microsomes. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1: 108-110
- Nöldner, M., Schotz, K. (2002) Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Med.* 68 (7): 577-580
- Ohara, O., Dorit, R., Gilbert, W. (1989) One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5673-5677
- Okada, Y., Ito, K. (2001) Cloning and analysis of Valerophenone Synthase Gene Expressed Specifically in Lupulin Gland of Hop (*Humulus lupulus* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (1): 150-155
- Orth, H. C. J., Rentel, C., Schmidt, P. C. (1999) Isolation, Purity Analysis and Stability of Hyperforin as a Standard Material from *Hypericum perforatum* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 193-200
- Orth, H. C. J. (1999) Isolierung, Stabilität und Stabilisierung von Hyperforin und Identifizierung seines Hauptabbauproduktes aus *Hypericum perforatum* L. *Dissertation*, Tübingen
- Orth, H. C. J., Hauer, H., Erdelmeier C. A. J., Schmidt, P. C. (1999) Orthofofin: The main degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* L. *Pharmazie* (short communications) 54: 76-77
- Öztürk, Y. (1997) Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl. 2: 125-128
- Paniego, N. B., Zuurbier, K. W. M., Fung, S.-Y., van der Heijden, R., Scheffer, J. J. C., Verpoorte, R. (1999) Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones. *Eur. J. Biochem.* 262: 612-616
- Peters, S., Schmidt, W., Beerhues, L. (1998) Regioselective oxidative phenol couplings of 2,3',4,6-tetrahydroxybenzophenone in cell cultures of *Centaurea erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. *Planta* 204: 64-69
- Philippu, A. (2001) In Vivo Neurotransmitter Release in the Locus Coeruleus – Effects of Hyperforin, Inescapable Shock and Fear. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl. 1): 111-115
- Reichling, J., Weseler, A., Saller, R. (2001) A Current Review of the Antimicrobial Activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl. 1): 116-118
- de los Reyes, G. C., Koda, R. T. (2001) Development of a simple, rapid and reproducible HPLC assay for the simultaneous determination of hypericins and stabilized hyperforin in commercial St. John's wort preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (5-6): 959-65
- Rocha, L., Marston, A., Kaplan, M. A., Stoeckli-Evans, H., Thull, U., Testa, B., Hosettmann, K. (1994) An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 36 (6): 1381-1385

- Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M. A., Stoeckli-Evans, H., Hostettmann, K. (1995) Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 40 (5): 1447-1452
- Rücker, G., Manns, D., Hartmann, R., Bonsels, U. (1995) A C₅₀-Hydroperoxide from *Hypericum perforatum*. *Arch. Pharm.* 328: 725-730
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Ehrlich, H. A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sakrkar, G., Kapelner, S., Sommer, S. S. (1990) Formamid can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acid Res.* 18: 7465
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Schempp, C. M., Pelz, K., Wittmer, A., Schöpf, E., Simon, J. C. (1999) Antibacterial activity of hyperforin from St. John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *The Lancet* 353: 2129
- Schempp, C. M., Winghofer, B., Ludtke, R., Simon-Haarhaus, B., Schopf, E., Simon, J. C. (2000) Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *Br. J. Dermatol.* 142 (5): 979-984
- Schmidt, P.-C. (2003) Formulierung von Johanniskrautextrakten; Galenisches Hindernisrennen. *Pharm. Unserer Zeit* 3: 203-211
- Schmidt, W., Abd El-Mawla, A. M. A., Wolfender, J. L., Hosettmann, K., Beerhues, L. (2000) Xanthones in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta Med.* 66: 380-381
- Schmidt, W., Peters, S., Beerhues, L. (2000) Xanthone 6-hydroxylase from cell cultures of *Centaureum erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. *Phytochemistry* 53 (4): 427-431
- Schmidt, W., Beerhues, L. (1997) Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *FEBS Letters* 420: 143-146
- Schön, H. (1987) Stilben-Synthase aus *Arachis hypogaea* Zellkulturen: Molekulare Eigenschaften und Regulation der Biosynthese. *Dissertation*, Marburg
- Schröder, J. (1997) A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. *Trends in plant science* 2 (10): 373-378
- Schröder, F. (1998) Induzierte chemische Abwehr bei Pflanzen. *Angew. Chemie* 110 (9): 1271-1274
- Schulz, V. (2003) Neue Therapiestudien und Metaanalysen; Johanniskrautextrakte vs. Synthetika. *Pharm. Unserer Zeit* 3: 228-234

- Schulz, V. (2003) Bieten Phytopharmaka ein Einsparpotenzial?; Pharmakoökonomie pflanzlicher Antidepressiva. *Pharm. Unserer Zeit* 3: 248-252
- Schüz, R., Heller, W., Hahlbrock, K. (1983) Substrate Specificity of Chalcone Synthase from *Petroselinum hortense*. *The Journal of Biological Chemistry* 258 (11): 6730-6734
- Singer A., Wonnemann, M., Müller, W. E. (1999) Hyperforin, a major Antidepressant Constituent of St. John's Wort, Inhibits Serotonin Uptake by Elevating Free Intracellular Na⁺. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290: 1363-1368
- Springob, K., Lukacin, R., Ernwein, C., Gröning, I., Matern, U. (2000) Specificities of functionally expressed chalcone and acridone synthases from *Ruta graveolens*. *Eur. J. Biochem.* 267: 6552-6559
- Staunton J., Weissman, K. J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millenium review. *Nat. Prod. Rep.* 18: 380-416
- Stöckigt, J., Schübel, H. (1989) Naturstoffe aus pflanzlichen Zellkulturen; Möglichkeiten und Grenzen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 23: 1187-1192
- Suh, D.-Y., Fukuma, K., Kagami, J., Yamazaki, Y., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Sankawa, U. (2000) Identification of amino acid residues important in the cyclization of chalcone and stilbene synthases. *Biochem. J.* 350: 229-235
- Tekelova, D., Repcak, M., Zemkova, E., Toth, J. (2000) Quantitative Changes of Dianthrone, Hyperforin and Flavonoids Content in the Flower Ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* 66: 778-780
- Trifunovic, S., Vajs, V., Macura, S., Juranic, N., Djarmati, Z., Jankov, R., Milosavljevic, S. (1998) Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry* 49 (5): 1305-1310
- Uebelhack, R., Franke, L. (2001) In Vitro Effects of St. John's Wort Extract and Hyperforin on 5HT Uptake and Efflux in Human Blood Platelets. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl. 1): 146-147
- Verotta, L., Appendino, G., Jakupovic, J., Bombardelli, E. (2000) Hyperforin Analogues from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *J. Nat. Prod.* 63: 412-415
- Wentworth, J. M., Agostini, M., Love, J., Schwabe, J. W., Chatterjee, V. K. (2000) St. John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor. *J. Endocrinol* 166 (3): 11-16
- Wolfender J. L., Verotta, L., Belvisi, L., Fuzzati, N., Hostettmann, K. (2003) Structural investigations of isomeric oxidised forms of hyperforin by HPLC-NMR and HPLC-MSn. *Phytochem. Anal.* 14 (5): 290-297
- Wolters, B., Eilert, U. (1983) Elicitoren - Auslöser der Akkumulation von Pflanzenstoffen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 13: 659-667

- Wurglics M., Westerhoff, K., Holoubek, G., Zsilavecz, M. S., Müller, W. E. (2002) Aktuelle Johanniskrautforschung. *Deutsche Apotheker Zeitung* 10: 1153-1175
- Wurglics, M., Westerhoff, K., Kaunzinger, A., Wilke, A., Baumeister, A., Dressman, J., Zsilavecz, M.-S. (2001) Comparison of German St. John's Wort Products According to Hyperforin and Total Hypericin Content. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 41 (4): 560-566
- Wurglics, M., Schubert-Zsilavecz, M. (2003) Chargenkonformität und biopharmazeutische Charakterisierung; Johanniskrautextrakt-Präparate im Vergleich. *Pharm. Unserer Zeit* 3: 236-241
- Yamaguchi, T., Kurosaki, F., Suh, D.-Y., Sankawa, U., Nishioka, M., Akiyama, T., Shibuya, M., Ebizuka, Y. (1999) Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 460: 457-461
- Yamamoto, H., Senda, M., Inoue, K. (2000) Flavanone 8-dimethylallyltransferase in *Sophora flavescens* cell suspension cultures. *Phytochemistry* 54: 649-655
- Yamazaki, Y., Suh, D.-Y., Sitthithaworn, W., Ishiguro, K., Kobayashi, Y., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Sankawa, U. (2001) Diverse chalcone synthase superfamily enzymes from the most primitive vascular plant, *Psilotum nudum*. *Planta* 214: 75-84
- Winship, P. R. (1989) An improved method for directly sequencing PCR-amplified material using dimethyl sulfoxid. *Nucleic Acid. Res.* 17: 1266
- Zapletalová, P. (1999) Untersuchungen zum Vorkommen von Hyperforin und Adhyperforin in Zellkulturen verschiedener Hypericum-Arten. *Diplomarbeit*, Bonn
- Zuurbier, K. W. M., Fung, S.-Y., Scheffer, J. J. C., Verpoorte, R. (1993) Assay of chalcone synthase activity by high-performance liquid chromatography. *Phytochemistry* 34 (5): 1225-1229
- Zuurbier, K. W. M., Fung, S.-Y., Scheffer, J. J. C., Verpoorte, R. (1995) Formation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* 38 (1): 77-82
- Zuurbier, K. W. M., Fung, S.-Y., Scheffer, J. J. C., Verpoorte, R. (1998) In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* 49 (8): 2315-2322
- Zuurbier, K. W. M., Leser, J., Berger, T., Hofte, A. J. P., Schröder, G., Verpoorte, R., Schröder, J. (1998) 4-Hydroxy-2-pyrone formation by chalcone and stilbene synthase with nonphysiological substrates. *Phytochemistry* 49 (7): 1945-1951

Basensequenz der *H. perforatum*-CHS

ATGGTGACCGTGGAAGAAGTCAGGAAGGCGCAGCGGGCCGAGGGTCCGGCCACCGTGATGGCCAT
CGGAACGGCCGTCCCGCCGAAGTGC GTTGATCAAGCGACGTACCCCGACTACTATTTCCGTATCAC
CAACAGTGAGCACAAGGCCGAGCTCAAGGAGAAGTTCCAACGCATGTGCGACAAGTCCCAAATCA
AGAAGCGTTACATGTACCTGAACGAGGAGGTCTAAAAGAGAACCCCAACATGTGTGCTTACATG
GCACCTTCTCTAGATGCTAGGCAAGACATTGTGGTGGTTGAAGTGCCCAAACTAGGTAAAGAGGCG
GCAGTTAAGGCTATTAAGGAATGGGGTCAGCCGAAATCCAAGATCACCCACTTGGTTTTTTGTACT
ACTAGTGGTGTGACATGCCCGGGGCTGACTACCAGCTCACCAAGCTATTGGGCCTCCGACCCTCG
GTCAAGCGTCTCATGATGTACCAACAGGGTTGCTTCGCCGGTGGCACGGTCCTCCGTCTCGCCAAG
GACCTTGCTGAGAACAACAAAGGCGCGCGCTCCTTGTCGTCTGCTCAGAGATCACGGCCGTTACC
TTCCGCGGTCCCACCGACACCCACCTCGACAGCCTTG TGGGTCAGGCATTGTTCCGTGACGGTGCT
GCCGCTATCATCATCGGCTCGGACCCCATCCCCGAGGTGAGAAGCCCTTGTTGAGCTGGTATCC
GCGGCCAGACCATCTGCCAGACAGCGAGGGGGCGATAGACGGACATCTTCGTGAGGTTGGGCT
TACATTCCATTTGCTCAAGGACGTACCCGGGTTGATCTCGAAGAACGTTGAGAAGAGTCTCACCGA
GGCCTTCAAACCATTGGGCATTTGAGACTGGAAGTCCCTGTTCTGGATCGCCCATCCCGGGGGGCC
AGCAATCTTGACCAAGTAGAGGAAAAGTTGAGCCTCAAGCCCGAGAAGCTTCGGGCCACAAGGC
ACGTCCTGTCCGAGTACGGCAACATGTCCAGTGCTTGTGTGCTCTTCATCTTGACGAGATGAGGA
GGAAGTCCAAGGAAGATGGGCTTAAGACCACAGGAGAAGGAATCGAGTGGGGAGTGCTTTTTGGA
TTTGGGCCTGGGCTTACCGTTGAGACCGTTGTCCTTCACAGTGTCGCATATTA

Aminosäuresequenz der *H. perforatum*-CHS

MVTVEEVRKAQRAEGPATVMAIGTAVPPNCVDQATYPDYYFRITNSEHKAELKEKFQRMCDKSQIKK
RYMYLNEEVLKENPNMCAYMAPSLDARQDIVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWGQPKSKITHLVFCTTSG
VDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITAVTFRGP
TDTHLDSL VGQALFGDGA AIIIGSDPIPEVEKPLFELVSAAQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVP
GLISKNVEKSLTEAFKPLGISDWNLSFWIAHPGGPAILDQVEEKLSLKPEKL RATHVLSEYGNMSSACV
LFILDEMRRKSKEDGLKTTGEGIEWGVLF GFGPGLTVETTVLHSVAY.

Abb. VIII-1: Basen- und Aminosäuresequenz der *H. perforatum*-CHS

Basensequenz der *H. calycinum*-CHS

ATGGTGACCGTGGAAGAAGTCAGGAAGGCGCAGCGGGCCGAGGGTCCGGCCACCGTGATGGCCAT
CGGAACGGCCCGTCCCGCCGAACTGTGTGCGACCAAGCGACGTACCCCGACTACTATTTCCGTATCAC
CAACAGCGAGCACAAGGCCGAGCTCAAGGAGAAGTTCCAACGCATGTGCGACAAGTCCCAAATCA
AGAAGCGTTACATGTACTTAAACGAGGAAGTCCTCAAGGAGAACCCCAATATGTGTGCTTACATGG
CACCTTCTCTGGATGCTAGGCAAGATATTGTAGTGGTGGAAGTGCCCAAATTGGGTAAAGAGGCTG
CAGTTAAGGCCATCAAGGAATGGGGCCAGCCCAAGTCCAAGATCACCCACTTGGTCTTTTGCACCA
CTAGTGGAGTGGACATGCCCCGGGGCCGACTACCAGCTACCAAGCTATTGGGCCTGCGCCCTTCGG
TCAAGCGTCTCATGATGTACCAACAGGGCTGCTTCGCTGGTGGCACGGTCTCCGTCTCGCCAAGG
ATCTCGCTGAGAACAACAAGGACGCGCGCGTCTTGTGTCTGCTCGGAGATCACAGCCGTTACCT
TCCGTGGGGCCACCGACACCCACCTCGACAGCCTCGTGGGGCAGGCATTGTTCTGGGGACGGTGCTG
CCGCGATCATCATAGGCTCGGACCCGATCCCCGAGGTCGAGAAGCCCTTGTTCTGAGCTGGTCTCCG
CGTCCCAGACCATCCTGCCGGACAGCGAGGGCGCGATAGACGGGCATCTACGCGAGGTTGGGCTT
ACATTCCACTTGCTCAAGGACGTACCCGGGTTGATCTCAAAGAACGTTGAGAAGAGCCTCACTGAG
GCCTTCAAACCATTGGGCATTTTCGACTGGAACCTCCCTATTCTGGATCGCCACCCGGGCGGCCCA
GCAATCTTGGACCAGGTAGAGGCCAAGTTGAGCCTCAAGCCCCGAGAAGCTACGGGCCACAAGGCA
CGTCCTCTCCGAATACGGTAACATGTCTAGTGCTTGTGTGCTCTTCATCTTGGACGAGATGAGGAGG
AAGTCCAAAGAAGATGGGCTTAAGACCACAGGAGAAGGAATCGAGTGGGGAGTGCTTTTTGGATT
TGGGCCTGGGCTTACCGTTGAGACCGTTGTCCTTCACAGTGTCGCCATTAAGTAG

Aminosäuresequenz der *H. calycinum*-CHS

MVTVEEVKRAQRAEGPATVMAIGTAVPPNCVDQATYPDYYFRITNSEHKAELKEKFQRMCDKSQIKK
RYMYLNEEVLKENPNMCAYMAYPSLDARQDIVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWGQPKSKITHLVFCTTSG
VDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNKDARVLVVCSEITAVTFRGP
TDTHLDSL VGQALFGDGAAAIIGSDPIPEVEKPLFELVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVP
LISKNVEKSLTEAFKPLGISDWSLFWIAHPGGPAILDQVEAKLSLKPEKLRATRHVLSEYGNMSSACVL
FILDERRRKSKEGDLKTTGEGIEWGVLFVFGPGLTVETVVLHVSAIN.

Abb. VIII-2: Basen- und Aminosäuresequenz der *H. calycinum*-CHS

Basensequenz der *H. perforatum*-BPS

ATGGCCCCGGCGATGGAGTACTCAACCCAGGAAGGCAACAGAAGGGCCAGCGTCCTCGCCATTGG
CACCACCAACCCGGACCACTTCATCCTTCAGGAGGATTACCCCGACTTTTACTTCAAGAACACCAA
CAGCGATCACATGGTCGAACTCAAGGAGAAATTTAAGCGCATTTGCGTGAAGTCTCATATTAGGAA
GAGGCACTTCTACCTGACCCAGGAGATTCTCAAGGCGAACCCCGGCATCGCCACCTACGGCGCGGG
CTCCCTCGACGCCCGCCAGAGGATCCTCGAGACCGAGGTCCCCAAGCTAGGCGAGAGGGCCGCCC
TCAAGGCTATCTCCGAGTGGGGCCAGCCCATCTCTAAGATCACCCATGTGGTGTTTCGCGACGACAT
CAGGGTTTCATGATGCCCCGGCGCAGACTACGCCATCACCCGCTCCTCGGCCTCAACCGCACCGTCA
GGCGCGTCATGCTCTACAACCAGGGTTGCTTCGCTGGCGGAACCGCTCTCCGCGTCGCCAAGGACC
TCGCGGAGAACAACGAGGGTGCGCGTGTGCTGGTCGTGTGCGCGGAGAATACCGCCATGACATTC
CACGCGCCCCAACGAGTCCCACCTCGACGTCATCGTGGGCCAGGCCATGTTCTCCGATGGTGCGGCC
GCTCTGATCATCGGGGCGGGTCCCGACGCTGCCTCGGGGGAGCGCGCAGTGTTCAATATCCTGTCT
GCGAGCCAGACGATCGTGCCCKGGTTTCGGACGGTGCGATAACKGCGCACTTTTACGAGATGGGGAT
GAGCTACTTCCTAAAGGAGGACGTCATTCTCTCTTCAGGGACAACATCGCCGCCGTCATGGAGGA
GGCCTTCTCCCCTCTTGGTGTCTCCGACTGGAACCTCCTCTTCTACTCCATCCACCCCGGCGGCCGC
GGCATCATCGACGGAGTCGCCGGAACCTGGGGATCAAGGACGAGAACCTTGTGGCCACCAGGCA
CGTGCTCGGCGAGTACGGGAACATGGGGTCGGCCTGCGTGATGTTTATAATGGACGAGCTCAGGA
AAAGCTCCAAGCTCAACGGGAAGCCCACCACCGGCGACGGAAAAGAGTTTCGGCTGCCTCATCGGA
CTCGGCCCCGGACTCACCGTCGAGGCCGTCGTCCTCCAGAGTGTCCCAATTCTCCAGTGA

Aminosäuresequenz der *H. perforatum*-BPS

MAPAMEYSTQEGNRRASVLAIGTTNPDHFLQEDYPDFYFKNTNSDHMVELKEKFKRICVKSHIRKRHF
YLTQEILKANPGIATYGAGSLDARQRILETEVPKLG ERAALKAI SEWGQPISKITHVVFATTSGFMMPGA
DYAITRLLGLNRTVRRVMLYNQGCFAGGTALRVAKDLAENNEGARVLVCAENTAMTFHAPNESHLD
VIVGQAMFSDGAAALIIGAGPDAAASGERAVFNILSASQTIVPGSDGAITAHFYEMGMSYFLKEDVIPLFR
DNIAAVMEEAFSPLGVSDWSLFLYSIHPGGRGIIDGVAGNLGIKDENLVATRHVLGEYGNMGSA CVMFI
MDEL RKSSKLNGKPTTGDGKEFGCLIGLGPGLTVEAVVLQSVPI LQ.

Abb. VIII-3: Basen- und Aminosäuresequenz der *H. perforatum*-BPS

Basensequenz der *H. calycinum*-BPS

ATGGCCCCGGCGATGGAGTACTCAACCCAGAACGGCCAGGGGGAAGGAAAGAAGAGGGCTAGTG
TCCTCGCTATTGGAACGACCAACCCGGAGCACTTCATCTTGCAGGAGGAATACCCAGATTTCTACT
TCAGGAACACTAACAGCGAGCACATGACCGATCTCAAGGAGAAGTTCAAGCGTATATGTGTAAAG
TCTCATATTAGGAAGAGGCACTTCTACCTGACGGAGGAGATCCTCAAGGAGAACCAAGGCATCGC
CACCTACGGCGCCGGCTCCCTCGACGCCCCGAGAGGATCCTTGAGACTGAGGTCCCCAAGCTCGG
ACAAGAGGCGGCCCTCAAGGCCATCGCGGAGTGGGGCCAACCCATCTCCAAGATCACCCACGTTG
TGTTTCGCTACGACCTCCGGGTTCATGATGCCAGGCGCGGACTACGCCATCACCCGACTTCTCGGCCT
CAACCGGACCGTCAGGCGCGTGATGCTCTACAACCAGGGCTGCTTTGCTGGGGGCACGGCTCTCCG
TGTCGCCAAGGACCTCGCCGAGAACAACGAGGGTGCGCGTGTGCTGGTCGTGTGCGCGGAGAATA
CCGCCATGACATTCCACGCGCCCAACGAGTCCCACCTCGACGTCATCGTGCGGCCAGGCCATGTTCT
CCGATGGTGCGGCCGCTCTGATCATCGGGGCGGGTCCCGACGCTGCCTCGGGGGAGCGCGCAGTGT
TCAATATCCTGTGCGCGAGCCAGACGATCGTGCCGGGTTCGGACGGGGCGATAACGGCGCACTTTT
ACGAGATGGGGATGAGCTACTTCCTAAAGGAGGACGTCATTCCTCTCTTCAGGGACAACATCGCCG
CCGTCATGGAGGAGGCCTTCTCCCTCTTGGTGTCTCCGACTGGAACCTCCCTCTTCTACTCCATCCA
CCCCGGCGGCCGTGGCATCATCGACGGCGTTGCCGGCAACCTAGGGATCAAGGACGAGAACCTTG
TGGCCACCAGGCACGTCCTCGGCGAGTACGGCAACATGGGGTTCGGCCTGCGTGATGTTTCATCCTGG
ACGAGCTCAGGAGGAGCTCCAAGCTCAACGGGAAGCCCACCACGGCGACGGCAAGGAGTTCGGC
TGCCTCATCGGCCTCGGCCCTGGCCTCACTGTGCGAGGCCGTCGTCCTTCAGGGTGTCCCCATCCTCC
AGTGA

Aminosäuresequenz der *H. calycinum*-BPS

MAPAMEYSTQNGQGEGKKRASVLAIGTTNPEHFILQEEYPDFYFRNTNSEHMTDLKEKFKRICVKSHIR
KRHFYLTEEILKENQGIATYGAGSLDARQRILETEVPKLGQEAALKAIAEWGQPISKITHVVFATTSGFM
MPGADYAITRLLGLNRTVRRVMLYNQGCFAAGTALRVAKDLAENNEGARVLVVCAENTAMTFHAPN
ESHLDVIVGQAMFSDGAAALIIGAGPDAASGERAVFNILSASQTIVPGSDGAITAHFYEMGMSYFLKED
VIPLFRDNIAAVMEEAFSPLGVSDWNSLFYSIHPGGRGIIDGVAGNLGIKDENLVATRHLGEYGNMGS
ACVMFILDRLRRSSKLNKPTTGDGKEFGCLIGLGPGLTVEAVVLQGVPILO.

Abb. VIII-4: Basen- und Aminosäuresequenz der *H. calycinum*-BPS

Basensequenz des Fragments 1 aus *H. calycinum*

ATGATGTATCAGCAGGGGTGCTTCGCCGGCGGCACCGTCCTCCGTCTCGCTAAGGACCTCGCCGAG
AACAACCGCGGTGCCCCGCGTCCTCGTCGTCTGCTCTGAGATCACGGCCGTACCTTCCGCGGTCCCT
CGGAGACCCACCTCGACTCCATGGTCGGGCAGGCGCTCTTTGGAGATGGAGCGGCCGCCGTTATCG
TCGGCGCTGACCCCGACCCGGTACTCGAGAAACCACTCTTCCAGCTCGTATCAGCCTCCCAAACCA
TCCTTCCGACTCTGAGGGGGGCCATCGACGGTCACCTGAGGGAGGTGGGACTCACCTTCCACCTGC
TCAAGGACGTACCCGGACTCATCTCGAAAAACATAGAGAAGAGCCTCGTGGAGGCGTTCAAGCCG
ATAGGGATCAGCGACTGGAACCCCTATTCTGGATAGCCCACCCGGGTGGGCCCCGCCATTTTGGAC
CAGGTGGAGGCCAAGCTGGCCCTCAAGGAGGAGAAGCTCCGGTCGACCCGACAAGTGCTCAGCGA
CTACGGGAACATGTCCAGCGCGTGTGTGCTGTTTATTCTCGACGAGATGAGGAAGAAGTCCGTCGA
GGAAGGGAAGCTCACCAACCGGAGAGGGGCTCGAGTGGGGCGTCCTATTCGGGTTTCGGACCCGGAC
TCACCGTCGAGACCGTCGTCCTCCACAGTCTACCCACCACCCAGCAGGCCGTTTCCGCCTAGATGA
TAACTAGATTTCCATTCTTCTTATTATTATTATTTTACTTTGGAATTAAATCTGGATTTTGGAC
GCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Aminosäuresequenz des Fragments 1 aus *H. calycinum*

MMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDSMVGQALFGDGAAAVIV
GADPDPVLEKPLFQLVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKNIEKSLVEAFKPIGISDW
NSLFWIAHPGGPAILDQVEAKLALKEEKLSTRQVLSDYGNMSSACVLFILDEMRRKSVEEGKLTTGEG
LEWGVLFGFGPGLTVETTVVLHSLPTTQQAVSA.

Abb. VIII-5: Basen- und Aminosäuresequenz des mutmaßlichen *H. calycinum*-BUS-Fragments 1

Basensequenz des Fragments 2 aus *H. calycinum*

CAGGTAACAACGCATGTTCTAAGCGAGTACGGGAACATGGGATCGGCTTGTGTTATTTTCATCCTC
GACGAGCTGAGGAAGAGAGCCAAGGAGGAGAAGAAGGCGACAACCGGAAACGGGAAGGATTACG
GTGTTCTCATCGGACTCGGGCCGGGTCTCACGGTGGAGTCCGTGCTCCTCCGTAGTGTCCCTATCGC
GTGAAGAAGCCCCCGAGTTGATTGTTTCCCATTTAAGTGTTATCTTATACTTCGTGGTTGGTGTA
TAATAATAATTCAGTTCTTTATGATTATGTTCTTATTAGTTTCTTTTAATTATGTGGTGATATGAAT
TACAATCAATAACAACACTTGTATCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Aminosäuresequenz des Fragments 2 aus *H. calycinum*

QVTTHVLSEYGNMGSACVIFILDELRRKRAKEEKKATTGNGKDYGVLI GLGPGLTVESVVLRSVPIA.

Abb. VIII-6: Basen- und Aminosäuresequenz des mutmaßlichen *H. calycinum*-BUS-Fragments 2

Basensequenz des mutmaßlichen BUS-Fragments aus *H. perforatum*

CCGTCACCTTCCGCGGTCCCTCGGAGACCCACCTCGATTCCATGGTCGGGCAGGCGCTCTTTGGAG
ATGGAGCGGCCCGCCGTTATCGTCGGCGCTGACCCCGACCCGGTACTCGAGAAACCACTCTTCCAGC
TCGTATCAGCCTCCCAAACCATCCTTCCGGACTCTGAGGGGGCCATCGACGGTCACCTGAGGGAGG
TCGGACTCACCTTCCACCTGCTCAAGGACGTACCCGGACTCATCTCGAAAAACATAGAGAAGAGCC
TCGTGGAGGCGTTCAAGCCGATAGGGATCAGCGACTGGAAGTCCCTATTCTGGATAGCCACCCGG
GTGGGCCCCGCCATTTTGGACCAGGTGGAGGCCAAGCTGGCCCTCAAGGAGGAGAAGCTCCGGTCG
ACCC

Aminosäuresequenz des mutmaßlichen BUS-Fragments aus *H. perforatum*

VTFRGPSETHLDSMVGQALFGDGAAVIVGADPDVLEKPLFQLVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTF
HLLKDVPGLISKNIEKSLVEAFKPIGISDWNLSFWIAHPGGPAILDQVEAKLALKEEKLRT

Abb. VIII-7: Basen- und Aminosäuresequenz des mutmaßlichen *H. perforatum*-BUS-Fragments

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ludger Beerhues, danke ich ganz besonders für die Überlassung des interessanten Themas, die stets freundliche Unterstützung, sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die vielseitigen Diskussionen.

Für die finanzielle Unterstützung, die mir den Aufenthalt und die wissenschaftliche Arbeit in Deutschland ermöglichte, möchte ich mich bei meinen Stipendiengebern, der Karls-Universität in Prag und dem DAAD bedanken.

Herrn Dr. Benye Liu danke ich für die zahlreichen Diskussionen und die wertvollen Hinweise zur Proteinexpression.

Es war mir ein besonderes Vergnügen, mit Herrn Dr. Heiko Schwarz ein Labor zu teilen. Ihm danke ich für die Einarbeitung in das Gebiet der Molekularbiologie und vor allem für das Lamm mit grünen Bohnen.

Frau Dr. A. Mellenthin und Herrn Dr. Till Beuerle danke ich für die Aufnahme der MS-Spektren. Herrn Beuerle außerdem für die Synthesen und für seine Motivation.

Bei den Mitarbeitern des Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in Braunschweig möchte ich mich für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten bedanken sowie bei Frau Ines Rahaus für die unermüdliche Sequenzierung.

Darüber hinaus danke ich meinen ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen in Bonn und Braunschweig für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Es hat Spaß gemacht!

Mein spezieller Dank gilt meinem Mann Frank, für das Korrekturlesen, seine Geduld und ermunternde Teilnahme, die bei der Fertigstellung dieser Arbeit von großem Wert waren.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und ihr Verständnis während des gesamten Studiums und der Doktorarbeit.

Lebenslauf

Petra Klingauf geb. Zapletalová

23.4.1976	geboren in Bruntál, Tschechische Republik
1982 – 1990	Gemeinschaftsgrundschule, Bruntál
1990 – 1994	Gymnasium, Bruntál
23.5.1994	Abitur
1994 – 1999	Studium der Pharmazie an der Karls-Universität zu Prag, Pharmazeutische Fakultät, Hradec Králové
August 1996	Praktikantin in der Löwenapotheke, Vilsbiburg
1997 – 1998	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Karls-Universität zu Prag, Pharmazeutische Fakultät, Hradec Králové
August 1997 und September 1998	Praktikantin in der Lemak-Apotheke, Bruntál
August 1998	Praktikantin in der Engel-Apotheke, Nördlingen
Oktober 1998 – Februar 1999	Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn; Erasmus-Stipendium
Juli 1999	Approbation als Apothekerin
September 1999	Apothekerin in der Lemak-Apotheke, Bruntál
Oktober 1999 - April 2004	Doktorandin am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn und am Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig; Erasmus- Stipendium, DAAD-Stipendium und ab Januar 2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig